

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CARACTÉRISATION DES CANAUX « TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL VANILLOID 4 »
(TRPV4) DANS LES LIGNÉES OSTÉOBLASTIQUES HUMAINE ET MURINE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

RACHEL PIERRE

JUIN 2013

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

La rédaction de ce mémoire m'a enseignée beaucoup autant au niveau personnel, sur mes forces et mes faiblesses, mais aussi beaucoup sur la science, sa beauté, ses mystères et ses questionnements encore non-résolus.

J'aimerais remercier tous ceux qui m'ont soutenu de toutes les manières possibles, car ce travail n'aurait pu aboutir sans l'aide de nombreuses personnes. Tout d'abord il y a mon directeur de mémoire, le Docteur Robert Moreau, qui tout au cours de ce travail s'est toujours montré à l'écoute et disponible et dont sa patience n'a pas de prix. Je lui dois mes reconnaissances. J'ai eu la chance d'effectuer mes recherches dans un environnement très agréable grâce à l'ensemble des membres du laboratoire et je tiens à leur adresser mes vifs remerciements pour leur collaboration; je m'adresse particulièrement à: Corine M, Olha K, Abdallah F., Véronique A., Jérôme L., Marine R., Celine S. Jaime S., Nilson Q. et Hugo R. Ils ont chacun à leur manière rendu mes 2 années de maîtrise mémorables. Une pensée spéciale à Vincent B. avec qui j'ai pu partager chaque étape aboutissant à cette rédaction. Je n'oublierai pas notre amitié.

Mes dernières pensées iront vers mes parents pour leur contribution, leur soutien et leur patience. Je tiens à remercier également ma sœur pour son appui et son support moral. À tous mes proches et amis qui m'ont toujours soutenue et encouragée au cours de la réalisation de ce mémoire, je vous dis un grand merci.

Je n'oublierai jamais cette expérience, qui, j'en suis certaine, forgera mon avenir.

Merci à tous,

Rachel Pierre

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	vii
LISTE DES SYMBOLES	x
RÉSUMÉ	xi
PROBLÉMATIQUE	xii
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES	1
1. 1 Introduction.....	1
1. 1. 1 L'os	1
1. 1. 2 Le remodelage osseux	6
1. 1. 3 Le calcium.....	14
1. 1. 4 Les canaux « transient receptor potential » (TRP).....	17
1. 2 Hypothèses et Objectifs.....	24
CHAPITRE II	
DÉMARCHE MÉTHODOLOGIQUE	26
2. 1 Matériel & méthodes.....	26
2. 1. 1 La culture cellulaire	26
2. 1. 2 L'analyse de l'expression génique par RT-PCR.....	26
2. 1. 3 Les mesures du calcium intracellulaire par microscopie confocale.....	27
2. 1. 4 L'évaluation de la viabilité cellulaire par des tests MTT.....	29
2. 1. 5 Les essais de migration par recouvrement cellulaire	29
2. 1. 6 La quantification de la sécrétion d'interleukine 6.....	30
2. 1. 7 La différenciation des cellules MC3T3.....	30
2. 1. 8 L'analyse de la minéralisation par une coloration au rouge alizarine.....	31
2. 1. 9 Le dosage de l'activité de la phosphatase alcaline.....	31
2. 1. 10 Le dosage des protéines cellulaires	32

2. 1. 11 Les analyses statistiques.....	32
2. 2 Résultats	35
2. 2. 1 L'analyse de l'expression génique des canaux TRPV dans les cellules MG-63	35
2. 2. 2 Le transport du calcium par les canaux TRPV4	35
2. 2. 3 Fonction cellulaire des canaux TRPV4 dans les MG-63	40
2. 2. 4 La différenciation des pré-ostéoblastes MC3T3	45
CHAPITRE III	
DISCUSSION & CONCLUSION	53
3. 1 Discussion	53
3. 1. 1 Expression génique des TRPV4 dans les MG-63	53
3. 1. 2 Induction d'un influx calcique par l'activation des canaux TRPV4	54
ANNEXE	
COMMUNICATION EN LIEN AVEC LE SUJET D'ÉTUDE.....	67
BIBLIOGRAPHIE	67

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figures	Page
1.1 Représentation des différentes structures de l'os.....	3
1.2 Les structures de l'os trabéculaire.....	3
1.3 : Les différentes étapes du remodelage osseux.....	7
1.4 : Facteurs influençant la résorption osseuse.....	9
1.5 Les différents mécanismes de régulation du calcium intracellulaire.....	16
1.6 Représentation des tétramères des canaux TRP.....	19
1.7 Représentation schématique des sous-familles des TRP exprimés chez l'humain.....	20
2.1 Expression génique des canaux TRPV2 et TRPV4 dans les cellules MG-63.....	36
2.2 Mesure de l'influx de calcium induit par le GSK.....	37
2.3 Inhibition de l'influx calcique induit par le GSK à 10 nM.....	38
2.4 Inhibition de l'influx calcique généré par le GSK à 1 nM.....	39
2.5 Effets d'inhibiteurs des canaux TRPV2 et TRPC sur l'influx induit par 10nM de GSK.....	40
2.6 Effet de l'activation de TRPV4 sur l'activité MTT des cellules MG-63.....	41
2.7 Représentation en image de la migration cellulaire des MG-63.....	43
2.8 Impact de l'activation de TRPV4 sur la migration des cellules MG-63.....	44
2.9 Quantification de la sécrétion d'interleukine 6.....	45
2.10 Expression génique des canaux TRPV4 dans les ostéoblastes murins MC3T3.....	47
2.11 Effet de l'activation de TRPV4 par le GSK sur l'activité MTT des cellules MC3T3.....	48

2.12	Activité MTT des cellules MC3T3 suite à des traitements prolongés avec le GSK.	49
2.13	Quantification de la minéralisation par coloration avec le rouge Alizarine suite à des traitements de différenciation en présence de GSK.	50
2.14	Quantification de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline des cellules suite à des traitements prolongés avec le GSK.....	52

Tableau		Page
2.1	Séquence des amorces utilisées afin de déterminer l'expression des gènes humains dans les cellules ostéoblastiques humaines MG-63.	33
2.2	Séquence des amorces utilisées afin de déterminer l'expression des gènes dans les cellules ostéoblastiques murines MC3T3.	34

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADNc	ADN complémentaire
ALPase	Phosphatase alcaline
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BAA	Bisandrographolide A
BMP	Protéines osseuses morphogénétiques
BSA	Albumine sérique de bovin
Ca	Calcium
Cbfa-1	Facteur de liaison nucléaire de la sous-unité alpha-1
CPC	Cetylpyridinium chloride
CRAC	Canaux activés par la libération du calcium
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
DAG	Diacylglycérol
DMEM/F12	«Dulbecco's modified eagle's medium/Nutrient mixture F-12»
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
FBS	Sérum fœtal bovin
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
Gd	Gadolinium
GSK	GSK1016790A
H-PRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase
IL-1	Interleukine 1

IL-4	Interleukine 4
IL-6	Interleukine 6
IP ₃	Inositol 1,4,5-trisphosphate
IP ₃ R	Récepteurs Inositol 1,4,5-trisphosphate
MCP-1	Protéine chimioattractante des monocytes
M-CSF	Facteur de stimulation de colonies de macrophages
MEM	« Minium essential medium »
MTT	Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
NaOH	Hydroxyde de sodium
NFκB	Facteur nucléaire kappa B
OCN	Ostéocalcine
OPG	Ostéoprotégérine
PBS	Tampon phosphate salin
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PMCA	Pompe calcique de la membrane plasmique
PNP	Para-nitrophényle
PNPP	Para-nitrophénylphosphate
PTH	Parathormone
RANK	Récepteur activateur du ligand NFκB
RANKL	Ligand du RANK
RE	Réticulum endoplasmique
RN	RN 1734
rpm	Rotation par minute
RRed	Rouge de ruthénium
RT-PCR	Transcription inverse suivie d'une amplification en chaîne par polymérisation
SERCA	Pompe calcique du réticulum endoplasmique

SNARE	Protéine soluble d'attachement au facteur sensible à la N-éthylmaleimide
TAE	Tris-Acétate-EDTA
TGF β	«transforming growth factor beta »
TRP	« transient receptor potential »
TRPA	« ankyrine transient receptor potential »
TRPC	« canonical transient receptor potential »
TRPM	« melastatin transient receptor potential »
TRPML	« mucolipin transient receptor potential »
TRPN	« non-mecanosensible transient receptor potential »
TRPP	« polycystin transient receptor potential »
TRPV	« vanilloid transient receptor potential »
VDCC	Canaux calciques voltage-dépendants
Wnt/ β -catenine	«Wingless-type MMTV integration site family member/ β -catenine»
α MEM	«Minimum essential medium alpha medium»

LISTE DES SYMBOLES

°C	Degré celsius
h	Heures
%	: pourcentage
µg	: microgramme
M	: molaire
min	: minute
mM	: millimolaire
mol	: mole
nM	: nanomolaire
pb	: pairs de base
p/v	: poids/ volume
sec	: seconde
U/ml	: unité par millilitre
v/v	: volume/volume
µM	: micromolaire

RÉSUMÉ

Le remodelage osseux est un processus étroitement régulé. Il implique la résorption de l'os par les ostéoclastes et la formation d'un nouvel os minéralisé par les ostéoblastes. En plus de contribuer à la synthèse de la matrice organique, les ostéoblastes régulent la différenciation des ostéoclastes et le processus de résorption. Ainsi, ces deux processus doivent être en équilibre afin de maintenir la masse osseuse. Un déséquilibre des processus de formation et de résorption osseuse peut mener au développement de l'ostéoporose associée à une réduction de la masse osseuse, une fragilité du tissu osseux, ce qui se traduit par des risques élevés de fractures. Le calcium est un second messenger intracellulaire impliqué dans plusieurs réactions métaboliques. Afin de lui permettre d'agir comme second messenger, plusieurs types de canaux calciques promouvoient l'entrée du calcium dans les cellules. Entre autres, les canaux « transient receptor potential vanilloid » (TRP) de type 4 (TRPV4) sont de canaux ioniques de la famille des canaux TRP exprimés dans plusieurs types cellulaires différents. Toutefois, leur caractérisation dans les ostéoblastes n'a toujours pas été effectuée. Le but de cette étude était de caractériser le rôle des canaux TRPV4 dans la régulation des fonctions ostéoblastiques en utilisant les lignées cellulaires humaines (MG-63) et murines (MC3T3). L'expression génique des canaux TRPV4 a été confirmée par une transcription inverse suivie d'une amplification par polymérisation en chaîne (RT-PCR). Des mesures de calcium intracellulaire à l'aide de la sonde fluorescente Fluo-3 ont indiqué que le GSK1016790A (GSK, 1 et 10 nM), un activateur des canaux TRPV4, induit un influx de calcium. Cet influx a été bloqué par l'inhibiteur sélectif des TRPV, le rouge de ruthénium (RRed), et par le RN 1734, un bloqueur sélectif des canaux TRPV4. L'étude des rôles des canaux TRPV4 sur les fonctions ostéoblastiques a révélé que l'activation de ces canaux par le GSK inhibe la migration des cellules MG-63. Cette inhibition de la migration a été renversée par le RRed et le RN 1734. De plus, l'activation des canaux TRPV4 par le GSK stimule la sécrétion d'interleukine 6 (IL-6) de manière dose-dépendante. Toutefois, le traitement avec le GSK n'a pas eu d'effet sur la différenciation des cellules MC3T3 évaluée par une coloration au rouge Alizarine de la minéralisation de la matrice et par un dosage de l'activité de la phosphatase alcaline. Ces résultats permettent de conclure que des canaux TRPV4 fonctionnels sont exprimés dans les lignées ostéoblastiques humaine MG-63 et murine MC3T3-E1. Lorsqu'activés, les canaux TRPV4 stimulent la sécrétion d'IL-6 et inhibent la migration des ostéoblastes. Les études portant sur l'implication des canaux TRPV4 dans la régulation des fonctions ostéoblastiques permettra de mieux cerner le rôle du calcium comme second messenger au niveau cellulaire dans les ostéoblastes et fournira une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de la formation osseuse et du remodelage.

Mots clés : formation – os – maturation – ostéoporose – transport - ion

PROBLÉMATIQUE

Afin de maintenir son intégrité et assurer ses fonctions, l'os est en continuel renouvellement. En effet, d'un côté les ostéoclastes vont dégrader le tissu osseux et ensuite les cellules ostéoblastiques vont procéder à la formation de la matrice de l'os et de sa minéralisation. En plus d'assurer la formation, les ostéoblastes sont aussi responsables de la régulation de la différenciation des ostéoclastes et de ce fait, s'assure le maintien de l'équilibre entre la formation et la résorption de l'os. Cet équilibre est essentiel pour avoir un os en santé. Plusieurs facteurs dont la ménopause, les blessures, les carences alimentaires ou les maladies menacent l'équilibre de l'os. Lorsque cet équilibre est rompu, il y a bien souvent le développement de l'ostéoporose. Cette maladie osseuse se caractérise par une diminution de la masse osseuse et un affaiblissement de la matrice osseuse, ce qui rend l'os plus susceptible aux fractures. Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes de régulation du remodelage osseux permettrait d'envisager des stratégies afin de prévenir et traiter l'ostéoporose.

Le calcium comme second messager intracellulaire est impliqué dans plusieurs fonctions des cellules. En effet, en plus d'agir sur les réactions métaboliques, il permet la transduction de signaux extracellulaires. Il constitue ainsi un bon moyen de régulation des fonctions cellulaires. Afin de transmettre les signaux extracellulaires, différents types de canaux ioniques sont présents à la membrane plasmique et leur ouverture permet l'entrée (influx) de calcium et ainsi la transduction du signal. Les canaux «transient receptor potential» (TRP) sont une grande famille de canaux ioniques. Les canaux TRP de la classe désignée «transient receptor potential vanilloïd» (TRPV) permettent le passage non-sélectif d'ion à travers la membrane plasmique et cette classe regroupe 6 membres de 1 à 6.

Notre laboratoire a rapporté l'expression génique du canal TRPV4 dans les cellules ostéoblastiques humaines et murines (Abed *et al.*, 2009). Toutefois, l'expression protéique et les rôles de ces canaux TRPV4 dans les ostéoblastes demeurent à être établis.

Le présent projet de recherche visait à identifier le rôle des canaux TRPV4, comme transporteur du calcium, dans la régulation des fonctions des cellules ostéoblastiques.

CHAPITRE I :

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1. 1 INTRODUCTION

1. 1. 1 L'os

Le squelette humain est constitué de 213 os qui sont regroupés en 4 catégories, soit les os longs (par exemple le fémur), les os courts (entre autres la rotule), les os qui ont une forme irrégulière (par exemple le coccyx) et les os plats (entre autres le sternum) (Clarke 2008). Le squelette est responsable des mouvements et de la locomotion et fournit support et protection aux organes (Clarke, 2008). De plus, le tissu osseux constitue une réserve accessible de minéraux par le remodelage afin d'assurer l'homéostasie de ceux-ci principalement le phosphate et le calcium. En fait, il contient 99% du calcium de l'organisme qu'il distribue en cas de carence (Blair *et al.*, 2007).

Le tissu osseux se retrouve sous deux formes : les parties trabéculaire et corticale (figure 1.1). L'os trabéculaire compose 20% de la masse osseuse. Il a une faible densité et fait partie de la structure interne des os long. Ce tissu poreux et spongieux est formé de réseaux de trabécules interconnectées remplis de moëlle (figure 1.2) (Hamed *et al.*, 2012). L'os trabéculaire est responsable de l'échange minérale avec les autres tissus de l'organisme. De ce fait, son processus de remodelage est constant (Hadjidakis et Androulakis, 2006). L'os cortical quant à lui est un tissu compact et

rigide. Il constitue en grande partie l'os squelettique (environ 80% de la masse). Il compose la partie externe des os longs et des os plats. Il comprend les ostéons, des structures cylindriques fibreuses qui regroupent des fibres de collagène minéralisée regroupée en lamelles. Les ostéons sont parcourus de vaisseaux sanguins transportant les nutriments à l'os cortical (figure 1.1) (Mullins *et al.*, 2007; Rho *et al.*, 1998). Au niveau de l'os trabéculaire, le transport de nutriments s'effectue par les vaisseaux de la moelle (Hamed *et al.*, 2012).

L'os cortical se renouvelle très peu comparativement à l'os trabéculaire. Ses structures fibreuses externes, le périoste, et internes, l'endoste, lui confèrent son rôle de soutien et de protection des structures internes de l'os dont les vaisseaux sanguins, les cellules et les nutriments (Brandi, 2009; Clarke, 2008). Malgré des différences fonctionnelles, l'os trabéculaire et cortical sont formés des mêmes composants de base soit des fibrilles de collagène minéralisés (Hadjidakis et Androulakis, 2006; Hamed *et al.*, 2012).

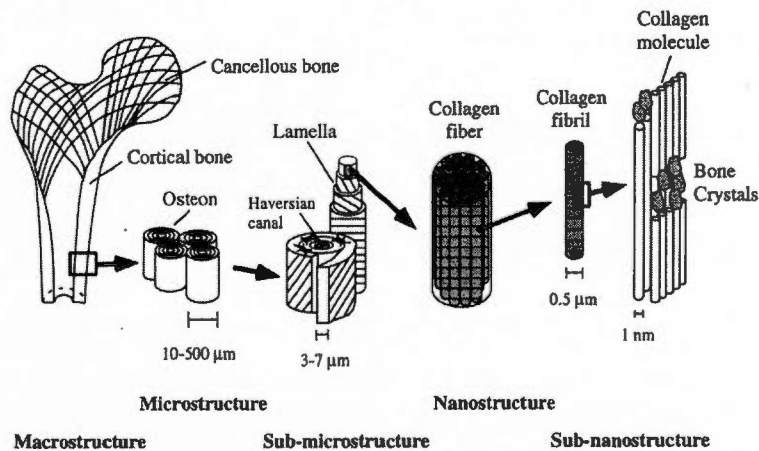


Figure 1.1 : Représentation des différentes structures de l'os. L'os est formé d'une partie trabéculaire et d'une partie corticale. Il comprend au niveau cortical des ostéons formés de canaux Haversian qui sont composés de lamelles de collagène. Chaque fibre comprend un ensemble de fibrilles de collagène composés de molécules de collagène de type I et de cristaux d'hydroxyapatite (Tiré de(Rho *et al.*, 1998)).

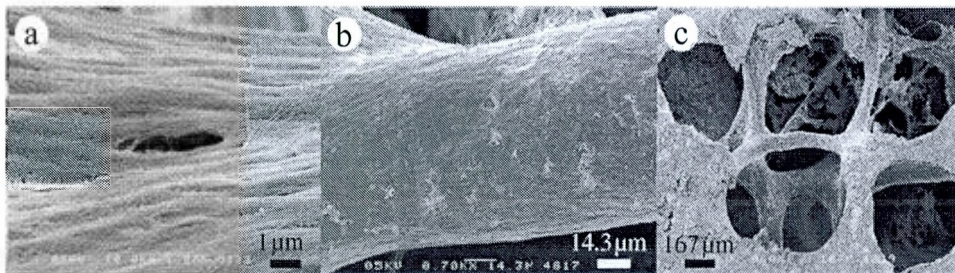


Figure 1.2 : Les structures de l'os trabéculaire. Représentation microscopique de la composition de l'os trabéculaire où chaque lamelle de fibrilles de collagène (a) est composé de trabécules (b) dont une structure poreuse (c) abrite la moëlle osseuse (Tiré de(Hamed *et al.*, 2012)).

1. 1. 1. 1 La composition du tissu osseux

Le tissu osseux est minéralisé et se compose ainsi d'une matrice organique extracellulaire et d'une matrice inorganique. La matrice organique regroupe les différentes protéines de l'os dont le collagène de type I, qui représente 90% des protéines de la matrice cellulaire. Cette protéine de la matrice organique est sécrétée par les cellules osseuses ostéoblastiques. Au sein de la matrice, le collagène de type I forme les fibrilles de collagène, des chaînes de polypeptides qui favorisent la stabilité de la matrice extracellulaire (Clarke, 2008). Les autres protéines du tissu osseux sont classées en 4 groupes comprenant les protéines protéoglycans, les glycoprotéines dont l'ostéopontine, les protéines contenant l'acide glutamique comme l'ostéocalcine et les protéines du sérum comprenant l'albumine et les facteurs de croissance. Ensemble, elles représentent 10% des protéines totales de la matrice organique du tissu osseux (Donley et Fitzpatrick, 1998).

La matrice inorganique confère la rigidité au tissu osseux et constitue un lieu d'entreposage des minéraux. Elle est principalement formée de calcium et de phosphate qui, sous l'influence de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline, forment les cristaux d'hydroxyapatite $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. Dans cette partie inorganique de l'os, on y retrouve aussi, en moindre quantité, du sodium et du magnésium (Downey et Siegel, 2006).

1. 1. 1. 2 Les cellules osseuses

Il faut noter que l'os est en continuel renouvellement. En effet, la croissance, les cassures et les réparations sont tous des phénomènes nécessitant un renouvellement de l'os. Ce processus, nommé le remodelage osseux, est orchestré par deux types de cellules osseuses d'origine différente, mais en interaction continuel : les ostéoclastes et les ostéoblastes.

1. 1. 1. 2. 1 Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont les cellules osseuses responsables de la dégradation de la matrice osseuse. Ils proviennent de cellules souches monocytaires hématopoïétiques qui se différencient sous l'action de signaux paracrines et autocrines pour donner naissance à des ostéoclastes matures prêts à exercer leur fonction de résorption. Ce sont de larges cellules multinucléées qui sont régulées de près par les ostéoblastes (Crockett *et al.*, 2011). Leur différenciation sera détaillée plus loin dans le document.

1. 1. 1. 2. 2 Les ostéoblastes

Les ostéoblastes sont les cellules osseuses responsables de la formation de la matrice osseuse. Contrairement aux ostéoclastes, ils ont une origine mésenchymateuse où les cellules souches pluripotentes se différencient en pré-ostéoblastes durant leur migration de la moelle osseuse vers le tissu osseux. Les ostéoblastes matures favorisent la genèse du tissu osseux tout d'abord en sécrétant le collagène de type I, l'ostéocalcine et l'ostéopontine (Phan *et al.*, 2004). Ils permettent aussi la minéralisation de l'os par la production de la phosphatase alcaline, protéine responsable de la formation des cristaux d'hydroxyapatite. Cette protéine est un biomarqueur reconnu de la minéralisation osseuse (Crockett *et al.*, 2011). Les ostéoblastes sont aussi fortement impliqués dans la régulation de la différenciation des ostéoclastes. De plus, ils participent à l'adhésion des ostéoclastes à la matrice osseuse, en dégradant la matrice non-minéralisée, ce qui fait des ostéoblastes un régulateur de la formation osseuse mais aussi de la dégradation de l'os (Sims et Gooi, 2008).

1. 1. 2 Le remodelage osseux

Le remodelage permet de générer et de régénérer le tissu osseux, et aussi de rétablir l'homéostasie de l'os en plus d'assurer son rôle de réservoir de calcium pour l'organisme. En effet, il facilite la formation du squelette adulte pour remplacer le squelette formé durant l'embryogénèse (Crockett *et al.*, 2011; Katagiri et Takahashi, 2002; Yamaguchi *et al.*, 2000). Il intervient aussi suite à une fracture pour la reconstitution adéquate de l'os brisé. Aussi, le remodelage osseux est sollicité afin de maintenir la calcémie par l'entremise de plusieurs hormones. Ils s'effectuent en différentes étapes débutant par la formation des ostéoclastes lors de l'ostéoclastogénèse, et se terminant par la création d'un nouveau tissu osseux minéralisé par les ostéoblastes matures (figure 1.3). Il implique des transformations morphologiques et tissulaires, la migration cellulaire ainsi que des régulations de facteurs paracrines et endocrines (Sims et Gooi, 2008).

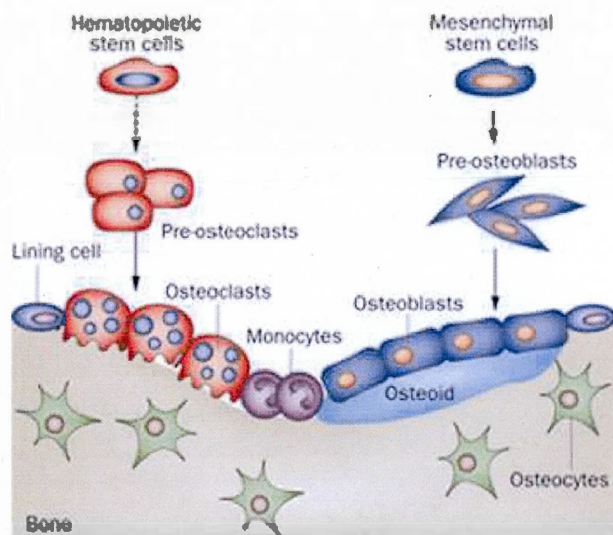


Figure 1.3 : Les différentes étapes du remodelage osseux. La différenciation des cellules souches hématopoïétiques en pré-ostéoclastes puis en ostéoclastes matures favorise la résorption osseuse. Les monocytes seront responsables de la formation de la couche ciment, la première phase organique de l'os. Cette étape facilitera l'ancrage des ostéoblastes sur le site de formation. Le nouvel os sera formé sous l'action des ostéoblastes matures différenciés des pré-ostéoblastes d'une origine mésenchymateuse. À la fin du processus de formation osseuse, les ostéoblastes matures deviendront quiescents et formeront les cellules bordantes localisées à la surface de l'os. Ils peuvent aussi se différencier en ostéocytes, des cellules qui se retrouvent trappées dans la matrice osseuse (Tiré de(Lian *et al.*, 2012).

1. 1. 2. 1. Les étapes du remodelage osseux

1. 1. 2. 1. 1 L'ostéoclastogénèse

Un cycle de remodelage débute par l'ostéoclastogénèse. Ce phénomène permet la formation des ostéoclastes par la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (CSH) sous l'action de facteurs de croissances. De la moelle osseuse, les CSH sont attirées par des chimiokines, dont la protéine chimioattractante des monocytes (MCP-1), sécrétée par les ostéoblastes, et se déplacent vers la surface

du tissu osseux (Nakahama, 2010). Par la suite, elles reçoivent différents signaux : les interleukines (IL) telles l'IL-1, l'IL-3, et l'IL-6, le facteur de stimulation de colonies de macrophages (M-CSF). Ces signaux les incitent à se différencier en cellules pré-ostéoclastes mononucléées (Manolagas, 2000). Cette différenciation implique l'expression du récepteur activateur du ligand facteur nucléaire kappa B (NFkB) (RANK), un facteur très important dans la maturation des ostéoclastes. En effet, son interaction avec son ligand, RANKL, retrouvé chez les ostéoblastes, est le signal nécessaire à la maturation des pré-ostéoclastes en ostéoclastes. Les pré-ostéoclastes fusionnent entre eux pour former des ostéoclastes matures multinucléés prêts à initier la résorption de l'os. Il a été démontré chez la souris qu'une mutation d'un des composants de l'interaction RANK-RANKL causait l'ostéopétrose, une maladie osseuse caractérisée par une diminution, voire une inhibition de la résorption osseuse (Katagiri et Takahashi, 2002). Plusieurs facteurs stimulent la résorption par l'interaction RANK-RANKL (figure 1.4) (Matsuo et Irie, 2008).

La maturation et la différenciation des ostéoclastes sont aussi régulées par l'ostéoprotégérine (OPG). Ce récepteur soluble est sécrété par les ostéoblastes et il interfère avec l'interaction RANK-RANKL en se liant à RANKL. Lors d'un diagnostic de maladies osseuses, le rapport RANKL/OPG est un indice important qui reflète le niveau de différenciation des ostéoclastes et le niveau de résorption osseuse (Matsuo et Irie, 2008).

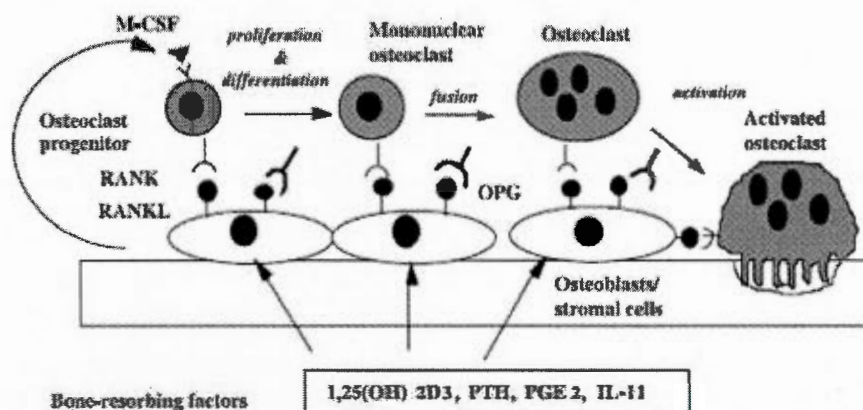


Figure 1.4 : Facteurs influençant la résorption osseuse. Les hormones et les cytokines telles la vitamine D aussi nommée $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, la parathormone (PTH), les prostaglandines E_2 et l'IL-11 sont des facteurs qui affectent le remodelage osseux au niveau de l'interaction RANK-RANKL. Le M-CSF sécrété par les ostéoblastes stimule la prolifération et la différenciation des pré-ostéoclastes en ostéoclastes. Durant ce processus, les ostéoclastes exprimeront le facteur RANK qui interagira avec son ligand ostéoblastique RANKL. Cette interaction favorisera la différenciation des ostéoclastes en ostéoclastes matures polynucléés prêts pour la résorption. En tout temps, il y a la sécrétion de l'ostéoprotégérine (OPG) qui bloque l'interaction RANK-RANKL (Tirée de Katagiri et Takahashi 2002).

1. 1. 2. 1. 2 La résorption osseuse

Suite à la maturation des ostéoclastes, la dégradation de la matrice osseuse débute. Ces cellules osseuses s'attachent à l'os minéralisé par l'intermédiaire de leurs molécules d'adhésion, les intégrines, qui interagissent avec les protéines de structure de la matrice osseuse telles l'ostéopontine, la fibronectine et le vitronectine. Cette interaction crée un micro-environnement propice à la dégradation du tissu osseux (Manolagas, 2000). L'acidification du micro-environnement, obtenue par l'action de pompes à proton, solubilisent les cristaux d'hydroxyapatite. La matrice organique est alors exposée à des métalloprotéinases, sécrétées par les ostéoclastes, qui la dégradent (Vaananen *et al.*, 2000). Il a été suggéré que durant la phase de dégradation de l'os, il

y aurait la libération de la matrice de facteurs de croissance qui stimuleraient la différenciation subséquente des ostéoblastes, favorisant ainsi dans un deuxième temps la formation osseuse.

1. 1. 2. 1. 3 L'étape d'inversion

Les ostéoclastes, par leur action de résorption, créent des cavités irrégulières dans l'os. Une étape de transition a lieu suite à la résorption osseuse où des cellules phagocytaires ainsi que des ostéocytes libérés préparent l'os à la formation de la nouvelle matrice (Clarke, 2008). Ces cellules procèdent à la digestion du collagène libéré par les ostéoclastes et d'autres produits de la résorption et à la formation d'une couche protéique nommée, la couche ciment, permettant l'ancrage des ostéoblastes sur celle-ci (Raggatt et Partridge, 2010; Sims et Gooi, 2008). Les étapes spécifiques de cette inversion ainsi que les types cellulaires impliqués ne sont pas bien connues. D'un côté, certains auteurs soupçonnent l'implication de monocytes-macrophages (Clarke, 2008; Raisz, 1999). D'un autre côté, des chercheurs pensent qu'il s'agirait de cellules ostéoblastiques (Raggatt et Partridge, 2010; Sims et Gooi, 2008).

1. 1. 2. 1. 4 La formation de l'os

Les étapes détaillées de la formation du nouveau tissu osseux n'ont pas encore été élucidées complètement. Toutefois, les cellules de la lignée ostéoblastique doivent migrer vers les lacunes formées par la résorption, proliférer et se différencier (Kular *et al.*, 2012; Manolagas, 2000). Une atteinte de l'une de ces fonctions cellulaires affecte la formation du tissu osseux. En ce sens, la migration est une fonction ostéoblastique importante, étant la première qui influencera la suite des événements de formation osseuse. Le processus de formation osseuse nécessite la différenciation

des ostéoblastes. Différentes voies de signalisation seraient impliquées dans cette différenciation, entre autres la voie Wnt/ β -caténine (Wingless-type MMTV integration site family member/ β -caténine) et la voie impliquant les protéines osseuses morphogénétiques (BMP). Ces voies activent des cascades de signalisation qui mènent à l'activation du facteur de transcription ostéoblastique Runx-2, aussi désigné facteur de liaison nucléaire de la sous-unité alpha-1 (Cbfa-1), qui à son tour induit l'expression de marqueurs ostéoblastiques tels que le collagène de type I, la sialoprotéine, l'ostéocalcine (OCN) et l'ostéopontine (Lin et Hankenson, 2011; Manolagas, 2000). Le processus de formation osseuse implique en premier lieu la formation de l'ostéoïde, la partie non minéralisée de l'os. Les ostéoblastes sécrètent le collagène ainsi que les protéines non-collagèneuses pour former la base souple non-minéralisée de l'os, la matrice organique (Hadjidakis et Androulakis, 2006; Sims et Gooi, 2008). Par la suite la matrice organique nouvellement formée sera minéralisée. La minéralisation s'effectue par les ostéoblastes matures. Ils libèrent dans le milieu des vésicules membranaires contenant les cristaux de phosphate de calcium. Ces vésicules déposent, d'une manière encore inconnue, les cristaux entre les fibrilles de collagène donnant un nouvel os minéralisé (Donley et Fitzpatrick, 1998; Downey et Siegel, 2006). À la fin de la formation de l'os, les ostéoblastes matures se différencient en 2 types cellulaires. Ils deviennent soit des cellules bordantes de l'os soit des ostéocytes (Clarke, 2008; Downey et Siegel, 2006). Les cellules bordantes sont situées à la surface de l'os et sont maintenant quiescentes. Les ostéocytes sont des ostéoblastes incrustés dans l'os. Ces cellules ont une forme allongée et développent des projections de leur membrane plasmique qui leur permettent de communiquer entre-elles à travers la matrice minéralisée (Clarke 2008).

1. 1. 2. 2 Régulation du remodelage osseux

Comme il a été mentionné plus tôt, les cellules ostéoblastiques sont les principaux régulateurs du remodelage osseux, et l'activité de ces cellules est soumise à une régulation par des facteurs systémiques et des facteurs locaux. L'hormone parathyroïdienne (PTH), la calcitonine, la 1,25-dihydroxyvitamine D (vitamine D) et les œstrogènes sont des facteurs systémiques agissant sur le métabolisme osseux. Ainsi en cas d'hypocalcémie, la PTH est libérée en circulation et ira stimuler la résorption osseuse afin de libérer le calcium stocké dans l'os (Hadjidakis et Androulakis, 2006; Raisz, 1999). Plus spécifiquement, la PTH se lie aux récepteurs PTH à la surface des ostéoblastes et induit ainsi la synthèse de RANKL. Ce dernier s'associe au RANK à la surface des pré-ostéoclastes, ce qui permet leur différenciation en ostéoclastes. Toutefois, la PTH aurait aussi une action anabolique. Il a été démontré qu'une utilisation intermittente de la PTH induisait la formation de l'os (Raisz, 1999), et cette approche est utilisée comme traitement de l'ostéoporose (Misiowski, 2011). L'antagoniste de la PTH, la calcitonine, agit suite à une hypercalcémie. Par ses récepteurs situés sur les ostéoclastes, elle inhibe la résorption osseuse et indirectement favorise la minéralisation de l'os (Crockett *et al.*, 2011). L'autre facteur, la vitamine D, stimule la résorption. Comme la PTH, elle a des actions anaboliques et cataboliques. Elle régule l'hypocalcémie en favorisant la libération du calcium de l'os et l'absorption du calcium par d'autres organes, tels l'intestin et les reins (Feldman, 1999). Elle favorise aussi la minéralisation de l'os en stimulant la différenciation des ostéoblastes (Feldman, 1999; Hadjidakis et Androulakis, 2006). L'un des régulateurs systémiques du remodelage osseux le plus important est l'œstrogène. Son effet sur l'os est plus visible avec l'âge, lors de la ménopause chez les femmes. La ménopause est caractérisée par une augmentation de l'incidence de l'ostéoporose. La chute des œstrogènes au moment de la ménopause cause une augmentation de la résorption osseuse associée à une différenciation accrue

des ostéoclastes, ce qui entraîne une diminution de la masse osseuse. L'œstrogène régulerait l'ostéoclastogénèse par l'interaction RANK-RANKL (Hadjidakis et Androulakis, 2006; Srivastava *et al.*, 2001). Les facteurs locaux sont souvent les cytokines et les facteurs de croissance tels les interleukines 4 et 1 (IL-4, IL-1) et le facteur de croissance de transformation (TGF β). Ils sont produits par les cellules dans le microenvironnement osseux. Plusieurs de ces facteurs agissent sur les cellules osseuses en modifiant l'expression de RANKL, RANK et OPG (Hadjidakis et Androulakis, 2006; Raisz, 1999). Les différents facteurs impliqués dans la régulation du remodelage osseux permettent de conserver l'homéostasie de l'os, son intégrité et sa structure. Malheureusement, plusieurs de ces facteurs sont aussi responsables du déséquilibre homéostatique menant à certaines maladies osseuses.

1. 1. 2. 3 Pathologie osseuse

Après la croissance osseuse qui a lieu en jeune âge, un équilibre entre la résorption et la formation osseuse est observé à l'âge adulte pour le bon maintien du tissu osseux. Par contre, certains événements peuvent perturber cet équilibre. Une fracture cause un arrêt temporaire du cycle naturel de remodelage pour favoriser la formation de l'os afin de réparer la fracture. À l'opposé, la ménopause et le vieillissement s'accompagnent d'une perte osseuse (Manolagas 2000). Certaines maladies touchant le métabolisme osseux sont connues. L'ostéopétrose regroupe un ensemble de maladies héréditaires associées à un dysfonctionnement au niveau des ostéoclastes et à une masse osseuse accrue (Stark et Savarirayan, 2009). Par contre, une diminution de la formation de l'os, de la minéralisation ou une augmentation du processus de dégradation de l'os mène à l'ostéoporose. Elle est caractérisée par une diminution de la densité osseuse et une augmentation de la fragilité de l'os (Downey et Siegel, 2006). L'ostéoporose peut être causée par une ménopause précoce avec une déficience des hormones sexuelles comme l'œstrogène, une inhibition de l'activité ostéoblastique ou un débalancement au niveau de la régulation du calcium (Downey

et Siegel, 2006; Raisz, 1999). Dans les différentes maladies osseuses, l'influx et les différentes voies de signalisation du calcium sont souvent impliqués (Blair *et al.*, 2007). En effet, le calcium est un second messenger impliqué dans la signalisation de plusieurs facteurs régulant le métabolisme osseux. C'est d'ailleurs de cette manière que leur implication dans ces différentes pathologies a été identifiée (Blair *et al.*, 2007). En effet, une anomalie dans l'influx du calcium aura des répercussions sur la transduction des signaux intracellulaires ce qui pourra causer un déséquilibre du remodelage osseux, et mener à des maladies.

1. 1. 3 Le calcium

Le calcium est l'un des ions les plus importants dans l'organisme. Il est impliqué à plusieurs niveaux des processus tissulaire et cellulaire de l'organisme. Dans le tissu osseux, comme présenté précédemment, le calcium participe directement à la formation de la partie inorganique du tissu osseux, étant un composant des cristaux d'hydroxyapatite. Ainsi mis en réserve, l'os constitue un réservoir ionique pour l'organisme. En effet, lors d'une hypocalcémie prolongée, l'organisme fait appel au calcium mis en réserve dans l'os pour réguler les demandes en calcium (Lieben et Carmeliet, 2012) par l'entremise de la PHT et la vitamine D qui agissent au niveau des mécanismes d'absorption et de libération par les tissus intestinal et osseux (Lieben et Carmeliet, 2012). Au niveau cellulaire, le calcium agit comme second messenger dans des réactions cellulaires en transmettant un signal venant du milieu extérieur (Petersen *et al.*, 2005). Le présent projet de recherche porte principalement sur ce rôle du calcium comme second messenger. La mobilisation du calcium vers le cytosol impliquerait 2 mécanismes. Une première voie provient principalement de la sortie du calcium du réticulum endoplasmique (RE). Cette dernière impliquent l'activation des récepteurs Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃R) (figure 1.5). L'activation des récepteurs IP₃R dépend du clivage par la phospholipase C de la

phosphatidylinositol 4, 5 biphosphate (PIP₂) en Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) et en diacylglycerol (DAG) suite à une activation d'une protéine G (Clapham, 2007). La deuxième catégorie favorise l'influx du calcium du milieu extracellulaire vers le cytosol par l'entremise de canaux calciques à voltage-dépendant (CaV) tels les canaux calciques voltage-dépendants (VDCC) et les canaux de la famille des TRP (Lieben et Carmeliet, 2012). Lors du processus de régulation et d'équilibre du calcium intracellulaire, les pompes calciques du réticulum endoplasmique (SERCA) et de la membrane plasmique (PMCA) sont responsables réciproquement de l'entrée du calcium cytosolique dans le RE et de sa sortie vers le milieu extracellulaire (figure 1.5) (Clapham, 2007). Cette étude se concentrera principalement sur les canaux TRP comme canaux calciques indépendants du voltage dans les ostéoblastes.

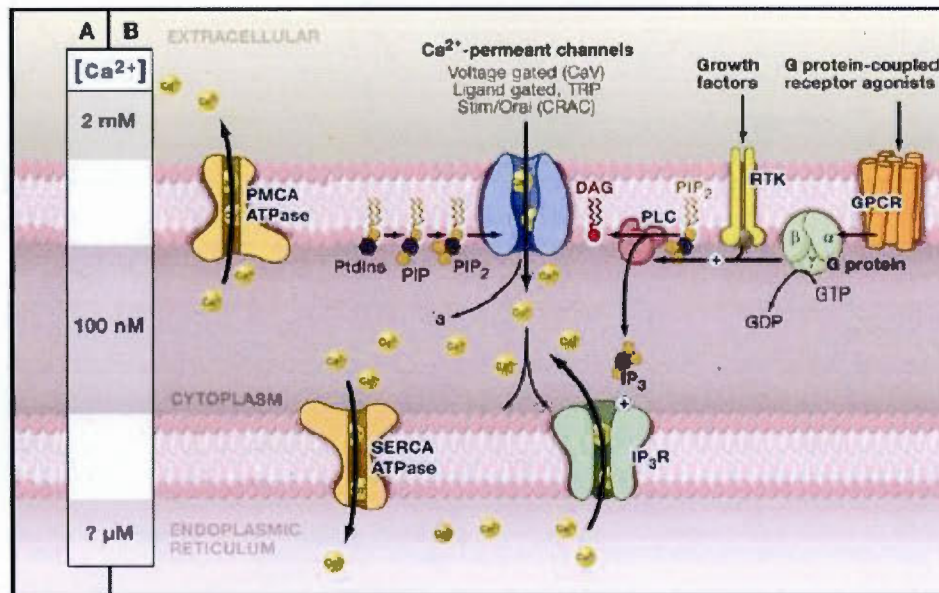


Figure 1.5 : Les différents mécanismes de régulation du calcium intracellulaire. Le transport du calcium vers le cytosol s'effectue par différentes protéines transmembranaires. Les canaux Ca^{2+} voltage-dépendants (CaV), les canaux ligand-dépendants et indépendants (TRP) et les canaux activés par la libération du calcium (CRAC) sont situés au niveau de la membrane plasmique et permettent le transport du calcium du milieu extracellulaire vers le cytosol selon le gradient du calcium extracellulaire (environ 2 mM) vers le cytosol (100nM). Au niveau intracellulaire, le RE constitue une réserve importante de calcium et sa libération vers le cytosol se fait par une stimulation des récepteur IP₃ (IP3R). Des récepteurs couplés à une protéine G (GPCR) et des facteurs de croissances peuvent induire la libération du calcium du RE en favorisant le clivage par la phospholipase C (PLC) du PIP₂ en DAG et IP₃. Le maintien de la concentration cytoplasmique s'effectue par les pompes PMCA qui favorisent l'expulsion du calcium contre son gradient vers le milieu extracellulaire et par les pompes SERCA situés au niveau du RE qui assurent la mise en réserve du calcium dans le RE (Modifié de (Clapham, 2007)).

1. 1. 3. 1. Les fonctions du calcium

Les fonctions du calcium dans la cellule sont nombreuses. En effet, son implication en tant que second messenger fait en sorte que le calcium participe à pratiquement toutes les réactions cellulaires. Par exemple, le calcium est grandement impliqué dans

la division et la prolifération cellulaire (Kahl et Means, 2003). Le calcium intracellulaire favorise aussi la synthèse d'ADN et de protéines et leur translocation dans les différentes organelles des cellules. En fait, un signal calcique prolongé est nécessaire pour la transcription. L'arrêt de ce signal cause un arrêt immédiat de la transcription génique (Berridge *et al.*, 2000; Kahl et Means, 2003). Il agirait aussi dans le contrôle du cycle cellulaire. Une diminution de sa concentration cytoplasmique résulterait en l'arrêt du cycle (Kahl et Means, 2003). Il a été démontré qu'une diminution du calcium extracellulaire cause un arrêt du cycle en phase G₁, et ainsi diminue le taux de prolifération cellulaire (Kahl et Means, 2003). Le calcium est aussi impliqué dans la régulation de la migration cellulaire. Ce processus cellulaire favorise la réparation lors de blessure, la croissance et est impliqué au niveau de la réponse immunitaire (Wei *et al.*, 2012). Dans le processus de migration, le calcium participe dans la régulation de l'adhésion des cellules. Il serait aussi impliqué dans la contraction des myosines ce qui permet le déplacement des lamellipodes et filopodes, les membranes d'extension formées pour permettre le déplacement cellulaire (Lauffenburger et Horwitz, 1996).

1. 1. 4 Les canaux « transient receptor potential » (TRP)

La grande famille des canaux TRP regroupe des protéines membranaires permettant le passage d'ions cationiques à travers la membrane plasmique. Ils ont été identifiés pour la première fois chez la drosophile. En effet, les chercheurs Cosens et Manning ont voulu identifier le phénomène cellulaire qui permettait à la drosophile *Melanomaster*, mutante au niveau de la photoréception de la lumière, de se déplacer (Cosens et Manning, 1969). En mesurant par électrorétinogramme la réponse électrique de l'œil de la drosophile à la lumière, ils ont découvert que la drosophile répondait de manière transitoire à l'intensité de la lumière contrairement à la drosophile sauvage dont la réponse électrique était soutenue. En d'autre terme, la

drosophile mutante enregistrait une réponse électrique transitoire à l'intensité de la lumière ce qui causait une alternance entre la lumière et la noirceur, ce qui leur permettait de se déplacer en période de noirceur. Ils ont désigné ce phénotype mutant de TRP (Transient Receptor Potential) (Minke, 2010; Nilius et Owsianik, 2011). Cette famille de protéine transmembranaire a par la suite été identifiée chez plusieurs autres espèces (Minke, 2010). Des protéines présentant des séquences homologues ont été retrouvées entre autres chez les nématodes et les poissons, ainsi que chez les mammifères. Ces canaux sont formés de 4 monomères protéiques (figure 1.6) et chaque monomère comprend 6 domaines transmembranaires (figure 1.7). Ils présentent des extrémités N-terminale et C-terminale intracellulaires et permettent le passage d'ions à travers un port formé entre le 5^e et 6^e segment transmembranaire (Minke, 2010). Ils présentent tous au niveau de leur extrémité N-terminale des domaines ankyrines de 33 acides aminés. Toutefois le nombre de domaines ankyrines (3 à 6) varient d'une sous-famille à une autre (Nilius et Owsianik, 2011). Au niveau de leur extrémité C-terminale, il y a présence de domaines et de motifs qui cependant n'ont pas été conservés parmi toutes les sous-familles et même parmi les membres d'une même famille (Nilius et Owsianik, 2011). Ces canaux se distinguent des canaux voltage-dépendants par leur transport d'ions ne nécessitant pas une activation dépendante de la polarité membranaire. De plus, ils ne sont pas sélectifs au niveau des ions cationiques et transportent différents ions cationiques divalents et rarement des ions monovalents. Certains ont par contre plus d'affinité pour le calcium et le magnésium. Chez les humains, ces protéines ont été identifiées dans plusieurs types cellulaires différents dont les cellules neuronales, les cellules endothéliales et les kératinocytes (Nilius et Owsianik, 2011).

1. 1. 4. 1 Classification des canaux TRP

Jusqu'à présent, six sous-familles de TRP ont été identifiées chez l'humain: les TRPM (*melastatin*), les TRPC (*canonical*), les TRPV (*vanilloid*), les TRPA (*ankyrin*), les TRPP (*polycystin*) et les TRPML (*mucolipin*) (figure 1.7) (Ramsey *et al.*, 2006). La 7^e famille, les TRPNM (NO-mechano-potential C') ne se trouve pas chez l'humain. Très peu d'informations sont connus pour TRPML, car le seul membre de cette famille a été identifié chez le poisson zébre (Nilius et Owsianik, 2011). Les plus connus et étudiés sont les TRPM comprenant 8 membres (TRPM1-8), les TRPC qui regroupent 7 membres (TRPC1-7) et les TRPV (Clapham *et al.*, 2003). Cette étude se concentrera sur la sous-famille des TRPV dont le premier membre a été identifié chez le nématode *C. elegans* (Minke, 2010).

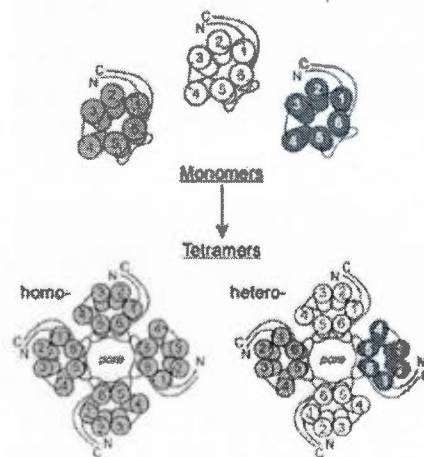


Figure 1.6 : Représentation des tétramères des canaux TRP. Les tétramères sont formées de 4 monomères de protéines. Elles peuvent être regroupées en homotétramère avec les 4 monomères identiques ou en hétérotétramère (Tiré de(Song et Yuan, 2010)).

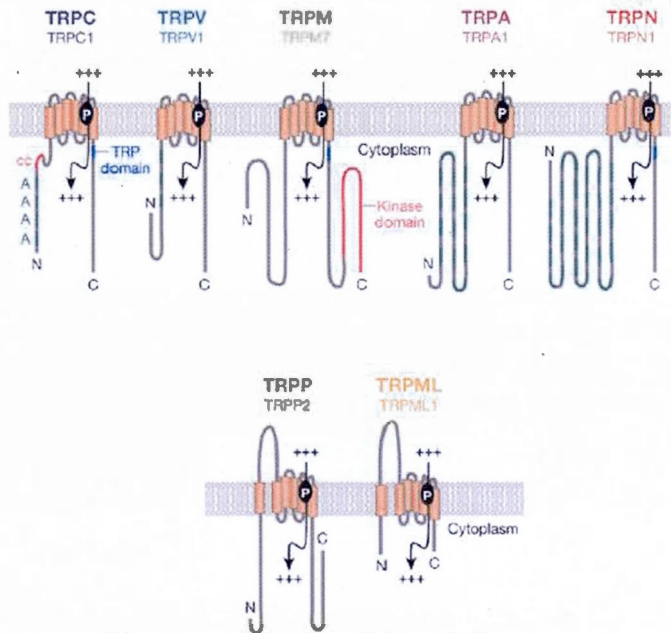


Figure 1.7: Représentation schématique des sous-familles des TRP exprimés chez l'humain. Chaque sous-famille représentée de l'un de leur membre est formée de 4 monomères protéiques. Chaque monomère est formé de six segments d'hélice alpha transmembranaires et de deux extrémités N-terminale et C-terminale intracellulaires. L'extrémité N-terminale comporte des domaines ankyrines et du côté C-terminal, il y a les domaines kinase (TRPM seulement) et des domaines TRP (TRPC et TRPN). Le port (P) est formé entre le 5^e et le 6^e segment transmembranaire et permet le passage d'ions vers le cytosol. Chaque sous-famille comporte des particularités dont la variation de la longueur des extrémités terminaux, la présence et la localisation des domaines et boîtes sur les extrémités terminaux et la position de la boucle entre les domaines transmembranaires (TRPP et TRPML) (Tiré de (Pan *et al.*, 2011)).

1. 1. 4. 2. La sous-famille des TRPV

La sous-famille des TRPV comprend 6 membres : TRPV1 à TRPV6. Ces canaux peuvent être regroupés en deux catégories selon leur perméabilité au calcium. Les TRPV1 à 4 ont une sélectivité au calcium plus faible que les TRPV5 et 6. Ces

derniers ont un ratio de perméabilité au calcium et au sodium (P_{Ca}/P_{Na}) supérieur à 100 (Everaerts *et al.*, 2010). Ils ont aussi plus de caractéristiques communes qu'avec les 4 autres membres. Ils interagissent souvent en hétérotétramères (Vennekens *et al.*, 2008). Les canaux TRPV1 sont les membres les plus connus de la sous-famille TRPV due en partie à leur rôle au niveau des récepteurs nocifs et thermosensibles. De plus, ils sont l'objet de plusieurs études dans le traitement contre la douleur (Vriens *et al.*, 2009). Les canaux TRPV2 sont analogues aux TRPV1 à plusieurs niveaux. Ils présentent 50% de similitudes au niveau de leur séquence, ils s'activent à des températures élevées supérieures à 52°C et sont exprimés principalement au niveau des neurones (Caterina *et al.*, 2000). Le canal TRPV2 est impliqué dans l'osmorégulation cellulaire (Pedersen *et al.*, 2005). Le canal TRPV1 serait quant à lui impliqué dans les voies de signalisation de la douleur. Il en est de même pour les TRPV3. Ces derniers ont aussi un rôle important dans la thermo-sensation. C'est entre autre pourquoi on les retrouve au niveau de la peau et du nez où ils sont fortement exprimés (Vriens *et al.*, 2009).

1. 1. 4. 2. 1 Les canaux TRPV4

Le présent document porte principalement sur les canaux TRPV4. Ce sont des protéines de 871 acides aminés. Ils comprennent 3 domaines ankyrines qui favorisent l'interaction protéine-protéine entre les TRPV4 et d'autres protéines intracellulaires (Nilius *et al.*, 2004; Everaerts *et al.*, 2010). Il existerait 5 variants de la protéine dont 2 seulement seraient fonctionnels (Vennekens *et al.*, 2008). La tétramérisation de la protéine, sa maturation et son activation dépendraient de domaines situés aux 2 extrémités terminales, entre autres des domaines ankyrine situés à l'extrémité N-terminale. La translocation de la protéine du réticulum endoplasmique vers la membrane cellulaire serait régulée par ubiquitination des extrémités terminales (Verma *et al.*, 2010). Ils ont plus tendance à former des homotétramères et ne pas s'associer à d'autres TRPV.

1. 1. 4. 2. 1. 1 Les agonistes et antagonistes de TRPV4

Initialement, les TRPV4 ont été identifiés comme récepteur osmotique. En effet, ces canaux seraient activés suite à une hypotonie cellulaire causant le gonflement de la cellule (Vincent *et al.*, 2009). Leur activation par la température les catégorise aussi comme thermo-senseur. Parmi les autres membres de la famille TRPV, ils seraient les seuls canaux sensibles à des températures autour de 24°C (Pedersen *et al.*, 2005). Le processus induisant leur activation par la température n'est pas encore connu. Les autres activateurs des canaux TRPV4 comprennent des ligands lipidiques endogènes tels l'acide arachidonique et l'acide endocannabinoïde, des ligands naturels isolés de plantes comme le bisandrographolide A (BAA) et des ligands synthétiques dont le GSK1016790A (GSK). Parmi les inhibiteurs des canaux TRPV4, le rouge de ruthénium (RRed) est le plus utilisé. En fait, il est un inhibiteur reconnu de tous les membres de la sous-famille des TRPV. Il agit en bloquant le site de liaison du ligand de manière réversible (Vriens *et al.*, 2009). Pour une inhibition sélective des TRPV4, le RN 1734 a été identifié et synthétisé dans les dernières années et présente des caractéristiques d'inhibition semblables à ceux du RRed en inhibant de manière réversible l'activation de TRPV4 dans diverses espèces incluant l'humain (Vincent *et al.*, 2009).

1. 1. 4. 2. 1. 2 L'expression et les fonctions de TRPV4

Les canaux TRPV4 sont exprimés dans plusieurs tissus et plusieurs espèces différentes. Leur expression est très documentée dans les cellules du système nerveux, mais on les retrouve aussi dans des cellules non-excitables comme les cellules rénales, les cellules épithéliales, les cellules testiculaires et les kératinocytes (Song et Yuan, 2010). Leurs fonctions dans ces cellules sont en grande partie liées à leur capacité d'agir comme mécano-senseur, d'être impliqué dans l'osmorégulation et sans oublier

leur rôle primaire de transport ionique (Pedersen *et al.*, 2005; Willette *et al.*, 2008). L'activation de TRPV4 inhibe la migration des cellules neuronales par un mécanisme encore inconnu (Zaninetti *et al.*, 2011) et induit la sécrétion de chimiokines par les cellules intestinales (D'Aldebert *et al.*, 2011). Au niveau du tissu osseux, les canaux TRPV4, comme transporteur calcique, sont impliqués dans la différenciation des ostéoclastes. Ils agissent en favorisant la formation des ostéoclastes multinucléés et une inactivation des TRPV4 causerait un déséquilibre osseux en faveur d'une augmentation de la masse osseuse (Masuyama *et al.*, 2008).

Les publications relatant le rôle des canaux TRPV4 comme transporteur calcique dans l'organisme sont en croissance. Malheureusement, c'est à travers les maladies résultantes de leur inactivation que l'on découvre son importance. En effet, la littérature reporte plusieurs maladies où la régulation des canaux TRPV4 serait en cause. Notons par exemple le diabète de type II avec une apoptose des cellules β du pancréas qui serait dû à une inactivation des canaux TRPV4. Au niveau du système respiratoire, les canaux TRPV4 seraient en partie responsables de maladies respiratoires pulmonaires (Everaerts *et al.*, 2010). Les précédents travaux de notre laboratoire ont indiqué la présence de transcrits pour les canaux TRPV4 dans les lignées MG-63 et MC3T3-E1 (MC3T3) (Abed *et al.*, 2009). Notre étude vise à une meilleure compréhension des canaux TRPV4 dans les ostéoblastes et leur possible implication dans les maladies osseuses plus précisément dans le développement de l'ostéoporose.

1. 2 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Puisque nos précédents travaux ont démontré la présence d'un transcrit pour les canaux TRPV4, nous émettons l'hypothèse que ces lignées ostéoblastiques expriment des canaux TRPV4 fonctionnels. Ainsi nos objectifs seront de confirmer l'expression génique des canaux TRPV4 dans les ostéoblastes ainsi que la présence d'une protéine membranaire fonctionnelle permettant le transport du calcium lorsque activée.

Selon la littérature, l'activation des canaux TRPV4 a été associée à la régulation de la migration de cellules neuronales (Zaninetti *et al.*, 2011), à la sécrétion de chimiokines par les cellules intestinales (D'Aldebert *et al.*, 2011), ainsi que la différenciation des ostéoclastes (Masuyama *et al.*, 2008). Comme mentionné, la formation osseuse repose sur les fonctions de migration, de prolifération et de différenciation des cellules de la lignée ostéoblastique. Nous postulons que l'influx calcique produit par l'activation des canaux TRPV4 serait associé à des modifications des fonctions ostéoblastiques. Ainsi, nos objectifs seront de déterminer l'effet de l'activation des canaux TRPV4 sur la prolifération et la viabilité, la migration et la différenciation des ostéoblastes.

Les cellules utilisées pour cette étude sont les cellules pré-ostéoblastiques humaines MG-63 isolées d'une tumeur osseuse (Benayahu *et al.*, 2001). Ces cellules présentent plusieurs caractéristiques des ostéoblastes, telles la prolifération et la migration, mais ne peuvent toutefois être différenciées *in vitro* (Benayahu *et al.*, 2001; Billiau *et al.*, 1977; Pautke *et al.*, 2004). Nous avons aussi utilisé le modèle cellulaire MC3T3-E1. Ce sont des cellules ostéoprogénitrices qui proviennent de calvaria de souris. Elles sont considérées des cellules non transformées et présentent *in vitro* un potentiel de différenciation en ostéoblastes matures et de former une matrice extracellulaire

minéralisée caractéristique des ostéoblastes (Declercq *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 1999; Yamaguchi *et al.*, 1998).

Cette étude permettra de mieux comprendre le rôle des canaux TRPV4 dans les ostéoblastes et l'implication possible de ces canaux comme canaux calcique dans la régulation des fonctions ostéoblastiques.

CHAPITRE II :

DÉMARCHE MÉTHODOLOGIQUE

2. 1 MATÉRIEL & MÉTHODES

2. 1. 1 La culture cellulaire

Les cellules ostéoblastiques humaines MG-63 (ATCC, Rockville, MD, USA) ont été maintenues en culture dans le milieu «Dulbecco's modified eagle's medium/Nutrient mixture F-12» (DMEM/F-12; Sigma, Oakville, Ontario, Canada) supplémenté de 10% de sérum fœtal bovin (FBS; Cansera, Etobicoke, Ontario, Canada), 2 mM de L-glutamine (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada), 100 U/ml de pénicilline (Invitrogen) et 100 µg/ml de streptomycine (Invitrogen). Les cellules pré-ostéoblastiques murines MC3T3 (ATCC) ont été maintenues en culture dans le milieu «Minimum essential medium alpha medium» (αMEM; Wisent Inc. Quebec, Canada) avec 10% de FBS, 2 mM de L-glutamine, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Les cellules ont été dispersées chaque semaine avec une solution de Trypsine-EDTA (0.05% trypsine, 0.02% EDTA) (Invitrogen) et gardées dans un incubateur à 37 °C avec atmosphère humide à 5% CO₂.

2. 1. 2 L'analyse de l'expression génique par RT-PCR

Les cellules MG-63 et MC3T3 ont étéensemencées dans des pétris de 60 millimètres (mm) (Sarstedt, Montréal, Québec, Canada). Lorsque la confluence de 80% était

atteinte, l'acide ribonucléique (ARN) total a été isolé. L'extraction a été effectuée à l'aide du Ribozol (Cedarlane, Burlington, Ontario, Canada) selon les instructions du fabricant. Puis l'ARN de l'extraction a été quantifié au spectrophotomètre selon le ratio 260 nanomètre (nm)/280 nm. L'acide désoxyribonucléique (ADN) complémentaire (ADNc) a été synthétisé à partir de 2 microgramme (μg) d'ARN à l'aide de la trousse « Omniscript RT kit » (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) en présence d'hexamères (10 micromolaire (μM)) (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne). Par la suite, l'ADNc a été amplifié par des réactions de polymérisation en chaîne (PCR) selon un programme de 40 cycles de 1 minute (min) à 94°C, 30 secondes (sec) à 58 °C et 1 min à 72°C en utilisant des amorces spécifiques (Eurofins MWG Operon, Alabama, USA) pour déterminer l'expression des gènes TRPV1 à 6 humains, le gène TRPV4 murin et les gènes de références de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (H-PRT) (tableau 2.I et tableau 2.II). Les amplicons obtenus ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose [2% poids/volume (p/v)] dans le tampon Tris-Acetate-EDTA (TAE; 0.04M Tris-base, 0.11% (volume/volume) acide acétique et 0.001 molaire (M) EDTA) en présence d'un standard de poids moléculaire (standard de 100 paires de base (pb; New England Biolabs, Massachusetts, United States) et la révélation a été effectuée à l'aide du RedSafe (Chembio Ltd, Hertfordshire, England) sous ultraviolet (UV).

2.1.3 Les mesures du calcium intracellulaire par microscopie confocale

Afin de réaliser des mesures de calcium intracellulaire, les cellules MG-63 ont été ensemencées dans des lab-Tek de 8 puits (Nalge Nunc, Napperville, IL, USA). À 80% de confluence, les cellules ont été rincées avec le tampon HEPES ([acide (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic)] 5.3 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 0.8 mM

MgSO₄, 120 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7.4) puis traitées durant 1 heure (h) dans le tampon HEPES avec une solution de marquage composée de la sonde Fluo-3-AM (4 µM) (Invitrogen), et du surfactant Pluronic F-127 (0,08%) (Invitrogen). Après le marquage, les cellules ont été lavées avec le tampon HEPES. Elles ont par la suite été incubées durant 1 h à 37°C dans le noir afin de compléter la de-estérification de la sonde. Au moment de prendre les mesures de fluorescence, les cellules ont été transférées dans un tampon HEPES sans calcium. Un champ de cellules a été sélectionné avec un microscope (Nikon TE300) à balayage confocal (BIORAD MRC-1024ES) à un objectif de 40X. Le champ fut divisé en 12 rectangles représentant les 12 répliques par expérience. Chaque rectangle regroupait une moyenne de 20 cellules. La fluorescence cellulaire de base fut prise dans un premier temps. Puis, la fluorescence due à une mobilisation du calcium intracellulaire fut mesurée durant 30 sec suivant l'ajout du GSK (1 nM et 10 nM), un activateur des TRPV4, dans le milieu sans calcium. En dernier lieu, du calcium (2.5 mM final) a été ajouté dans le milieu d'incubation et les mesures de fluorescence furent enregistrées pendant 2 min. Une augmentation de la fluorescence représente une augmentation de la concentration du calcium dans le cytosol soit par la sortie du calcium contenu dans le RE (la mobilisation calcique) ou par l'entrée du calcium du milieu extracellulaire vers le cytosol (influx calcique). Lorsque la fluorescence en présence des inhibiteurs était évaluée, une incubation de 10 min précédant l'ajout du GSK était effectuée avec les inhibiteurs tels le RRed (20 µM) (Sigma), un antagoniste des TRPV; le RN (20 µM) (Tocris Bioscience, United Kingdom), un inhibiteur des canaux TRPV4; le tranilast (75 µM) (Tocris Bioscience), utilisé pour inhiber les TRPV2 et le gadolinium (Gd; 100 mM) (Sigma), un inhibiteur de la sous-famille TRPC. Les résultats ont été normalisés à la fluorescence cellulaire de base précédant l'ajout du GSK pour les 12 répliques.

2. 1. 4 L'évaluation de la viabilité cellulaire par des tests MTT

Les cellules MG-63 et MC3T3 ont été ensemencées dans des plaques de 96 puits (Sarstedt). À 80% de confluence, les cellules ont été traitées durant 48 h à des concentrations croissantes de GSK (0-20 μ M) dans le milieu DMEM/F12 (MG-63) ou MEM («Minium essential medium », Hyclone, Utah, USA; MC3T3) sans sérum. Après le traitement, les cellules ont été incubées à 37°C en présence de 0.5 mg/ml de sel de tétrazolium (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium, désigné MTT) (Sigma) durant respectivement 1 à 2 heures. Durant cette incubation, les enzymes mitochondriales procèdent à la réduction du substrat en cristaux de formazan insolubles dans le milieu de culture. Ces cristaux ont été solubilisés avec le diméthylsulfoxyde (DMSO) durant 1 h à 37 °C. Une mesure colorimétrique a été prise au spectrophotomètre à 575 nm. Les valeurs obtenues ont été normalisées par la condition contrôle sans GSK (0 nM GSK) et représente l'activité MTT relative au contrôle.

2. 1. 5 Les essais de migration par recouvrement cellulaire

Des essais de migration ont été effectués avec les cellules MG-63 en culture dans des plaques de 12 puits (Sarstedt). À 100% de confluence, les cellules ont été grattées à l'aide d'un embout stérile et une photo a été prise au microscope optique (Axiovert Zeiss 2000) à un objectif 10X lié à une caméra CoolSNAP Es au temps 0h. Ensuite, les cellules ont été traitées durant 16 heures avec le GSK (10 nM) seul ou en présence des inhibiteurs RRed (20 μ M) et RN (20 μ M). Des photos ont été prises à la fin des traitements. Le recouvrement cellulaire fut calculé à l'aide du programme ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) en évaluant le recouvrement de l'espace grattée au temps 0h et après 16 heures de traitement. Le recouvrement est présenté en valeur relative au contrôle des cellules dans le milieu DMEM/F12 sans

sérum pour 3 à 5 expériences. Le traitement au facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF; 100 ng/ml) (Sigma) représente le contrôle positif d'une stimulation de la migration cellulaire.

2. 1. 6 La quantification de la sécrétion d'interleukine 6

Les cellules MG-63 ont étéensemencées dans des plaques de 96 puits. À 80% de confluence, les cellules ont été traitées avec différentes concentrations de GSK durant 24 h dans le milieu DMEM/F-12 sans sérum. Par la suite, les milieux de culture ont été récoltés, centrifugés durant 5 minutes à 2500 rotation par minutes (rpm) et les surnageants ont été congelés à -20°C jusqu'aux analyses. Les niveaux d'IL-6 ont été quantifiés par un dosage de type ELISA (BD OptEIA, Mississauga, ON, Canada) selon les recommandations du fournisseur. Une mesure au spectrophotomètre à 450 nm (correction à 570 nm) a été effectuée. Un test MTT a été réalisé sur les cellules après le prélèvement du milieu. Les niveaux d'IL-6 sont exprimés en valeurs relatives à l'activité MTT.

2. 1. 7 La différenciation des cellules MC3T3

Les cellules MC3T3 ont été mises en culture durant 1 semaine dans des plaques de 24 puits (Sarstedt) jusqu'à l'atteinte d'une confluence de 100%. Afin de favoriser la différenciation des cellules pré-ostéoblastiques en ostéoblastes matures, les cellules ont été traitées avec le milieu MEM avec 10% de sérum ou avec le milieu MEM contenant 10% de sérum, 50 µg/ml d'acide ascorbique (vitamine C) (Sigma) et 5 mM de glycérol-2-phosphate. La vitamine C et le glycérol-2-phosphate favorise la différenciation des cellules ostéoblastiques *in vitro* (Lin et Hankenson, 2011). Le traitement de différenciation a été effectué 3 fois par semaine durant 3 semaines.

2. 1. 8 L'analyse de la minéralisation par une coloration au rouge alizarine

Durant les 3 semaines de différenciation, les cellules ont été traitées à des concentrations croissantes de GSK. À la fin de chaque semaine, un groupe de cellules a été fixé dans 1 millilitre (ml) d'éthanol 70% froid durant 1 h, puis rincées à l'eau nanopure. À la fin du traitement, les cellules fixées ont été incubées avec 2% de rouge alizarine (Sigma) [(p/v) dans 10% de cetylpyridinium chloride (CPC)] durant 15 min à la température pièce. Elles ont ensuite été lavées 3-4 fois à l'eau distillée durant 5 min. Les dépôts de calcium colorés par le rouge alizarine ont été solubilisés avec le CPC [10% CPC (p/v) dans 10 mM Na_2PO_4 ; équilibré à pH 7 avec du NH_4OH 30%] durant 1 h à la température pièce. Une mesure colorimétrique du rouge alizarine a été prise au spectrophotomètre à 575 nm. La quantité de dépôts formés a été calculée par rapport au dépôt calcique de la semaine 1 et est proportionnelle à la quantité de cristaux de calcium formés.

2. 1. 9 Le dosage de l'activité de la phosphatase alcaline

A la fin de chaque semaine de traitement de différenciation, les cellules MC3T3 différenciées et non-différenciées ont été rincées avec un tampon phosphate salin (PBS) froid (0.1 g/L CaCl_2 , 0.2 g/KCl, 0.2 g/L KH_2PO_4 , 0.1 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 8 NaCl et 1.44 g/L Na_2HPO_4 , pH 7.4) puis solubilisées avec le tampon phosphatase alcaline (ALPase) (100 mM glycine, 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ et 1% Triton X-100; pH 10.5) durant 1 h à 4°C avec agitation. Le dosage de l'activité de la phosphatase alcaline a été réalisé dans des plaques de 96 puits en duplicatas en incubant 75 μl de la suspension cellulaire avec 75 μl d'une solution de pNPP (1 :1; 12.5mM p-nitrophenylphosphate dans le tampon ALPase) (Sigma) durant 1h-2h à 37°C. En présence de phosphatase

alcaline, il y a hydrolyse du pNPP en pNP (para-nitrophényl). La formation d'un produit jaune proportionnel à la quantité de pNP formée est observée. Cette réaction a été arrêtée par l'ajout de 100 μ l de 1M NaOH. La quantification a été obtenue par une lecture de la plaque au spectrophotomètre à 410 nm. Une courbe standard de pNP a été réalisée à chaque expérience. L'activité phosphatase alcaline a été normalisée par la quantité totale de protéine contenue dans la suspension cellulaire.

2. 1. 10 Le dosage des protéines cellulaires

Un dosage de la quantité de protéines contenue dans la suspension de cellules récupérées pour le dosage de phosphatase alcaline a été effectué. Le dosage colorimétrique a été réalisé dans des plaques 96 puits selon la méthode BCA avec les réactifs microBCA (Pierce, Rockford, USA). Une courbe standard a été réalisée à chaque expérience en utilisant l'albumine sérique de bovin (BSA, Sigma) comme protéine standard. La lecture a été effectuée à 570 nm.

2. 1. 11 Les analyses statistiques

Les valeurs obtenues suite aux expériences réalisées sont exprimées en moyenne \pm erreur-type (SEM) et ont été analysées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Des analyses statistiques ont été effectuées sur des moyennes de 3 expériences et plus. Les tests statistiques de variance (Anova 1-Way, post-test Turkey), des tests T de Student, et de co-variance (Anova 2-Way, post-test Bonferroni) ont été réalisés pour des valeurs significatives à 95% (* $p < 0.05$), 99% (** $p < 0.01$) et 99.9% (***) $p < 0.001$).

Tableau 2.1 : Séquence des amorces utilisées afin de déterminer l'expression des gènes humains dans les cellules ostéoblastiques humaines MG-63.

Gènes		Séquences	Numéro de référence
TRPV1	Sens	5'-GGACAAGTGGGACAGATTCGTC-3'	NM_080704.3
	Antisens	5'-CTCAGGATCATCTTCTCTATCATGACG-3'	
TRPV2	Sens	5'-CAAGGGACTTGCTTTTATTCGG-3'	NM_016113.4
	Antisens	5'-CAGAAGCCAGGTCATACAGCG-3'	
TRPV3	Sens	5'-CAACACCAAGGAGATAGTGC GG-3'	NM_001258205.1
	Antisens	5'-TCCGCAGTAGGATCATGTCTGAC-3'	
TRPV4	Sens	5'-ACACCAAGTTTGTTACCAAGATGTACG-3'	NM_021625.4 NM_147204.2 NM_001177433.1 NM_001177431.1 NM_001177428.1
	Antisens	5'-CGATCATGAAGAGCAAGTAGACGAG-3'	
TRPV5	Sens	5'-TCTCGCTATTTTGAAAGACGATTC-3'	NM_019841.4
	Antisens	5'-CAGCCAGCAGAAACGCATTAG-3'	
TRPV6	Sens	5'-GCCTATGGAGCAAGTTCTGCAG-3'	NM_018646.3
	Antisens	5'-CACCCAGCATGCAGAAGTACG-3'	
H-PRT	Sens	5'-GACCAGTCAACAGGGGACATAA-3'	NM_000194.2
	Antisens	5'-AAGCTTGCGACCTTGACC-3'	

Tableau 2.2 : Séquence des amorces utilisées afin de déterminer l'expression des gènes dans les cellules ostéoblastiques murines MC3T3.

Gènes		Séquences	Numéro de référence
TRPV4	Sens	5'-AAGATGTACGACCTGCTGC-3'	NM_022017.3
	Antisens	5'-TAGGAGACCACGTTGATGTAGAAGG-3'	
GAPDH	Sens	5'-GGAGATTGTTGCCATCAACGA-3'	NM_008084.2
	Antisens	5'-TGGGAGTTGCTGTTGAAGTCG-3'	

2. 2 RÉSULTATS

2. 2. 1 L'analyse de l'expression génique des canaux TRPV dans les cellules MG-63

Dans le but d'identifier les fonctions des canaux TRPV4 dans les ostéoblastes humains MG-63, l'expression génique de ces canaux à tout d'abord été vérifiée. Une amplification de type PCR à partir de l'ARNm isolée des cellules MG-63 a été effectuée en utilisant des amorces spécifiques pour les gènes H-PRT (gène de référence) et TRPV4 (tableau 2.I). Les résultats démontrent la présence de 2 produits de PCR lorsque les paires d'amorces pour TRPV4 ont été utilisées (figure 2.1). Les tailles des amplicons correspondent aux 2 tailles attendues pour des variants du gène TRPV4 répertoriés dans la base de données géniques (GenBank), soit un premier variant à 866 pb et un deuxième variant à 686 pb dont l'expression est légèrement plus forte. Nous avons, par la suite, voulu vérifier quels autres membres de la famille des TRPV étaient exprimés chez les ostéoblastes MG-63. Nous avons utilisé des amorces spécifiques aux autres membres de la sous-famille TRPV (TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV5 et TRPV6) et effectué des réactions PCR dans les mêmes conditions. Parmi ces membres, un produit de PCR a été obtenu pour TRPV2 (432pb) dans les MG-63 (figure 2.1).

2. 2. 2 Le transport du calcium par les canaux TRPV4

Par la suite, nous avons voulu déterminer si les canaux TRPV4 étaient fonctionnels dans les cellules MG-63. Ainsi, nous avons effectué des mesures de calcium intracellulaire et nous avons utilisé un activateur sélectif pour ces canaux, le GSK (Willette *et al.*, 2008). La figure 2.2 montre une invariabilité de la fluorescence lorsque le GSK est ajouté dans un milieu sans calcium. Cette invariabilité permet

d'exclure la possibilité d'une mobilisation du calcium venant du RE. Lorsque du calcium a été ajouté au milieu d'incubation (2.5 mM final), une augmentation de la fluorescence cellulaire a été enregistrée (figure 2.2). Cette fluorescence représente l'entrée du calcium extracellulaire dans le cytosol de la cellule, ce qui est caractéristique d'un influx calcique. L'influx calcique induit par le GSK a été mesuré avec 1 nM de GSK et 10 nM de GSK. Il est à remarquer que l'augmentation de la concentration de GSK entraîne une augmentation de la fluorescence avec une fluorescence maximale relative passant de 1.65 pour GSK 1 nM à 3.27 pour GSK 10nM.

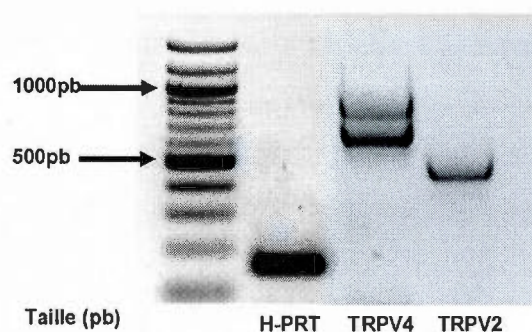


Figure 2.1 : Expression génique des canaux TRPV2 et TRPV4 dans les cellules MG-63. L'ADNc des cellules MG-63 a été amplifié par PCR en utilisant des amorces spécifiques pour les canaux TRPV2 et TRPV4 humains. La taille du produit PCR attendu pour TRPV2 est de 432 pb et 2 variants de 686 (NM_001177433.1) et de 866 pb (NM_001177431.1) pour TRPV4. Le gène HPRT a été utilisé comme gène de référence et la taille du produit PCR attendu est de 163 pb. Cette photo est représentative de 4 expériences réalisées à partir de préparations différentes d'ARN.

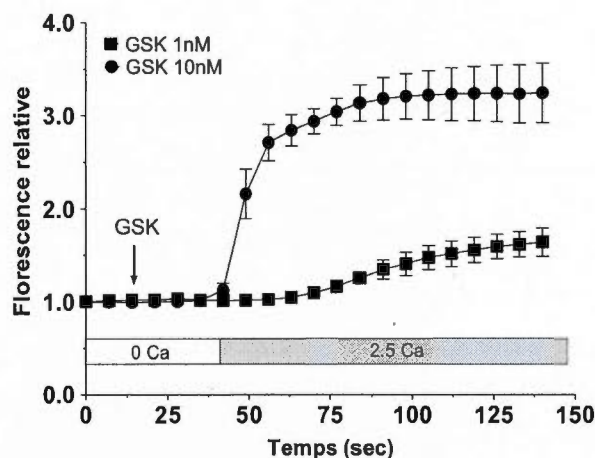


Figure 2.2 : Mesure de l'influx de calcium induit par le GSK. Les cellules MG-63 ont préalablement été marquées avec la sonde Fluo-3AM. Les niveaux de calcium intracellulaire ont été mesurés par microscopie confocale à fluorescence. Le GSK a été ajouté au milieu sans calcium (0 Ca) et des mesures de fluorescence ont été prises pendant environ 30 sec. Par la suite, du calcium a été ajouté au milieu d'incubation (2.5 mM final; 2.5 Ca) et les mesures se sont poursuivies pour environ 2 min. Les données sont exprimées par la moyenne \pm SEM des valeurs relatives de fluorescence comparées aux valeurs basales avant traitement de 5 expériences indépendantes.

Afin de confirmer que l'influx observé provenait de l'activation de canaux TRPV4, nous avons utilisé des bloqueurs. Une pré-incubation des cellules avec le RRed (20 μ M), un inhibiteur de tous les canaux TRPV, inhibe totalement l'influx induit par le GSK à 10nM (figure 2.3a). Lorsque les expériences ont été effectuées avec une pré-incubation des cellules en présence de RN 1734, un inhibiteur sélectif des canaux TRPV4, l'influx généré par 10nM de GSK a été inhibé à 87% (figure 2.3b). Nous avons refait les expériences en utilisant une concentration plus faible de GSK (1nM). Comme précédemment aucun influx n'a été obtenu avec le GSK suite à une pré-incubation des cellules avec le RRed (figure 2.4a). De plus, l'influx en présence de 1

nM GSK a été totalement inhibé suite à une pré-incubation des cellules en présence de RN 1734 (figure 2.4b).

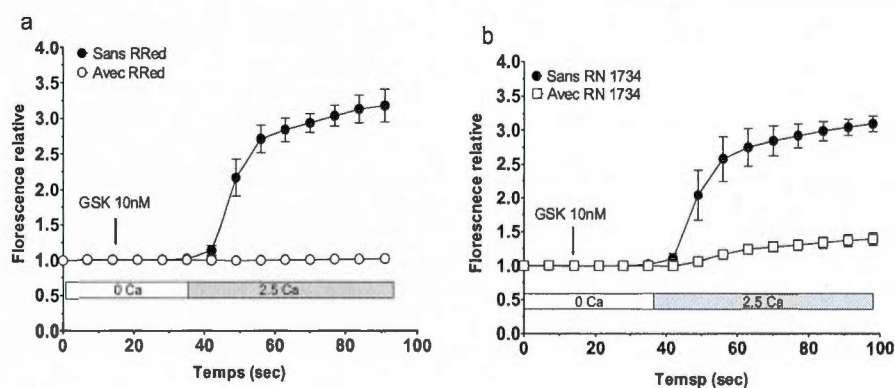


Figure 2.3: Inhibition de l'influx calcique induit par le GSK à 10 nM. Les cellules MG-63 ont été préalablement marquées avec la sonde Fluo-3AM. Avant de prendre les mesures, les cellules ont été incubées avec les inhibiteurs (a) RRed (20 μ M) et (b) RN 1734 (20 μ M) durant 10 min dans un milieu sans calcium (0 Ca). La fluorescence cellulaire a été mesurée par microscopie confocale à fluorescence. Des mesures ont été prises durant 30 sec après l'ajout du GSK. Elles se sont poursuivies après l'ajout du calcium (2.5 Ca). Les résultats représentent les moyennes \pm SEM des valeurs relatives de fluorescence comparées aux valeurs basales avant traitement de 5 à 8 expériences indépendantes.

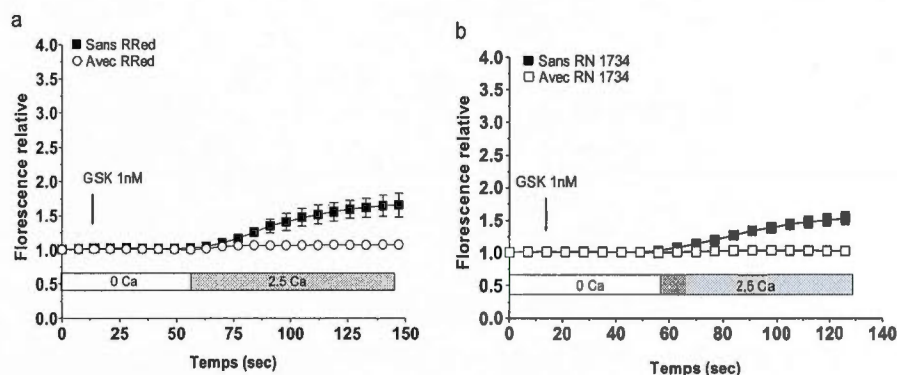


Figure 2.4 : Inhibition de l'influx calcique généré par le GSK à 1 nM. Les cellules MG-63 ont été marquées avec la sonde fluorescente Fluo-3AM. Les cellules ont par la suite été incubées dans un milieu sans calcium (0 Ca). Les cellules ont été pré-incubées avec les inhibiteurs (a) RRed (20 μ M) et (b) RN 1734 (20 μ M) durant 10 min. La fluorescence cellulaire a par la suite été mesurée par microscopie confocale à fluorescence. Les mesures se sont poursuivies durant 30 secondes après l'ajout du GSK (1 nM) puis 2 min suivant l'ajout du calcium dans le milieu d'incubation. Les mesures de fluorescence représentent les moyennes \pm SEM des valeurs relatives de fluorescence comparées aux valeurs basales avant traitement de 4 expériences indépendantes.

Puisque l'utilisation d'amorces pour les canaux TRPV2 a permis d'obtenir un produit d'amplification, nous avons souhaité vérifier que l'influx obtenu avec le GSK n'impliquait pas une activation des canaux TRPV2. Pour cela, nous avons effectué à nouveau les expériences en pré-incubant les cellules MG-63 avec un inhibiteur des canaux TRPV2, le tranilast, à 75 μ M. Puis, comme précédemment, nous avons mesuré la fluorescence obtenue suite à l'ajout de GSK. L'influx obtenu avec le GSK n'a pas été inhibé par la pré-incubation des cellules avec le tranilast (figure 2.5a). Nous avons aussi utilisé le gadolinium (Gd) comme inhibiteur des canaux TRPC. Des recherches effectuées dans notre laboratoire nous ont démontré que des membres de la sous-famille des TRPC sont exprimés dans les MG-63 (Abed *et al.*, 2009). Les

résultats démontrent que l'influx obtenu avec GSK n'a pas été inhibé en présence de gadolinium (Gd 100 μ M) (figure 2.5b).

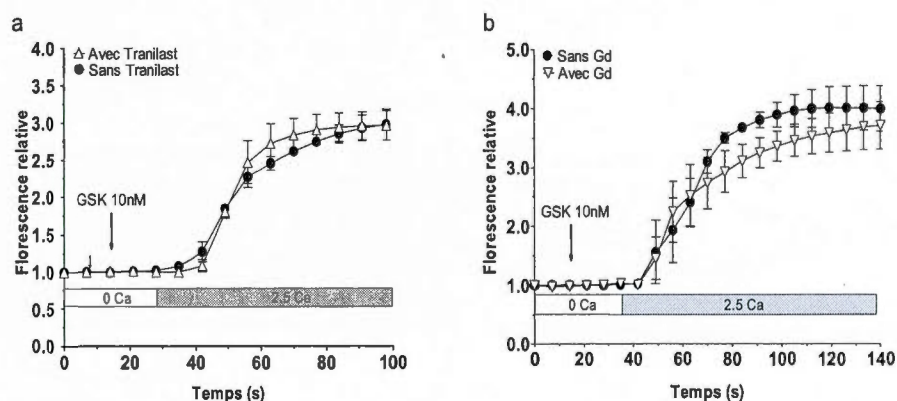


Figure 2.5 : Effets d'inhibiteurs des canaux TRPV2 et TRPC sur l'influx induit par 10nM de GSK. Les cellules MG-63 ont tout d'abord été marquées avec la sonde Fluo-3AM. Avant de prendre les mesures, les cellules ont été incubées avec les incubateurs (a) 75 μ M de tranilast et (b) 100 μ M gadolinium (Gd) durant 10 min dans un milieu sans calcium (0 Ca). La fluorescence cellulaire de base a été prise par microscopie confocale à fluorescence. Le GSK a été ajouté et la fluorescence a été enregistrée durant 30 sec. Des mesures se sont suivies durant 30 sec après l'ajout du GSK puis durant 2 min après l'ajout du calcium (2.5 Ca). Les résultats représentent les moyennes \pm SEM des valeurs relatives de fluorescence comparées aux valeurs basales avant traitement de 5 à 8 expériences indépendantes.

2. 2. 3 Fonction cellulaire des canaux TRPV4 dans les MG-63

Après avoir évalué si les canaux TRPV4 étaient fonctionnels dans les cellules MG-63, nous nous sommes concentrés sur l'évaluation des effets d'une activation des canaux TRPV4 sur les fonctions des cellules MG-63.

2. 2. 3. 1 Effet du GSK sur l'activité MTT des MG-63

Nous avons débuté par une étude visant à déterminer l'influence de l'activation des TRPV4 sur la prolifération et la viabilité des cellules MG-63. Un essai MTT a donc été effectué suivant un traitement des cellules avec le GSK. Les cellules MG-63 ont été traitées durant 48 h à des concentrations croissantes de GSK. Les résultats obtenus montrent une diminution de l'activité MTT des cellules MG-63 à partir de 20 μ M de GSK (figure 2.6). Cette diminution de l'activité enzymatique mitochondriale des cellules MG-63 représente une diminution de leur viabilité.

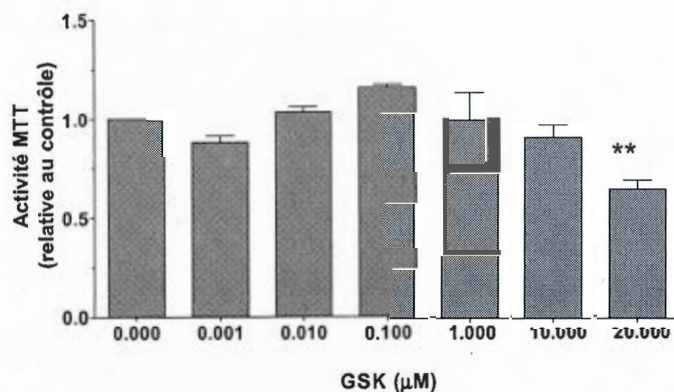


Figure 2.6 : Effet de l'activation de TRPV4 sur l'activité MTT des cellules MG-63. Les cellules ostéoblastiques MG-63 ont été traitées durant 48 h avec des concentrations croissantes de GSK dans le milieu de culture sans sérum et l'activité MTT a été mesurée. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de l'activité MTT relative au contrôle sans GSK de 4 expériences indépendantes. Test de variance Anova : **p < 0.01.

2. 2. 3. 2 Évaluation de l'influence de l'activation des canaux TRPV4 sur la migration cellulaire

Nous avons par la suite évalué les effets d'une activation des canaux TRPV4 sur la migration cellulaire, une fonction importante des ostéoblastes. La migration des ostéoblastes vers les lacunes de résorption est une des premières étapes de la formation osseuse. Le recouvrement d'espace libre par les cellules a été évalué pour des traitements de 16 h (figure 2.7). Nous avons utilisé le PDGF comme contrôle positif et les résultats montrent une stimulation de 25% du recouvrement cellulaire par le PDGF comparativement au contrôle (figure 2.8). Les cellules ont été traitées dans un milieu DMEM/F12 sans sérum à 10nM de GSK. Lorsque l'on compare les résultats obtenus de GSK 10 nM au contrôle, une diminution significative de 12 % du recouvrement cellulaire a été observée (figure 2.8). En effet, il y a eu plus de surface couverte par les cellules dans les puits contrôle que dans les puits contenant le GSK (figure 2.7). Cette inhibition a été renversée lorsque les cellules ont été traitées au GSK en présence de 20 μ M RRed ou 20 μ M RN. La surface couverte par les cellules après 16h de traitement se rapprochait de celle du contrôle après 16h (figure 2.7).

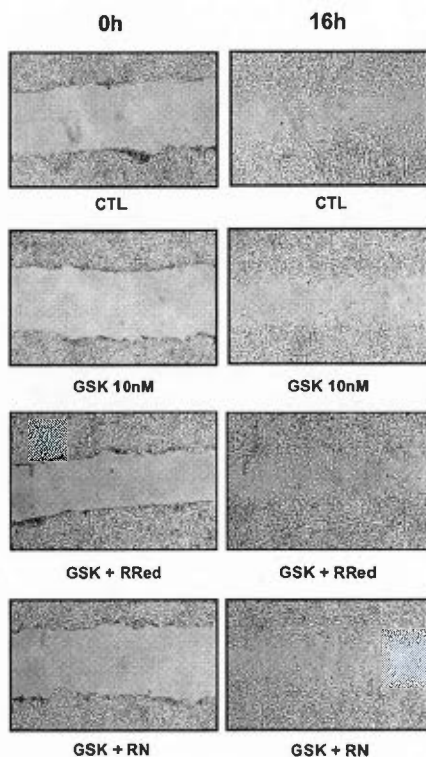


Figure 2.7 : Représentation en image de la migration cellulaire des MG-63. A une confluence totale, des cellules ont été détachées. Les cellules ont été traitées avec le GSK 10 nM seul et en présence des inhibiteurs RRed (20 μ M) ou RN (20 μ M). Un groupe de cellules a été traité avec les inhibiteurs seuls. Une photo a été prise au microscope au temps 0 h et 16 h après les traitements. L'analyse du recouvrement cellulaire a été effectuée avec le logiciel ImageJ. Le contrôle (CTL) représente les cellules dans le milieu de culture DMEM/F12 sans sérum et la condition avec le PDGF (50 ng/ml) représente le contrôle positif.

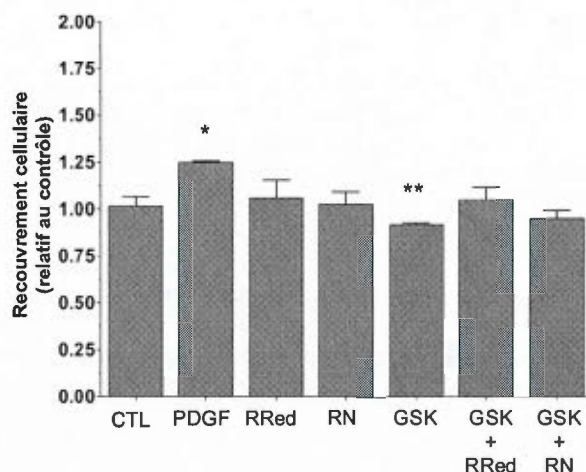


Figure 2.8 : Impact de l'activation de TRPV4 sur la migration des cellules MG-63. À confluence, certaines cellules de la monocouche ont été détachées avec un embout. Après une prise de photos, les cellules adhérentes ont été traitées durant 16 heures avec le milieu seul (CTL), le PDGF (50 ng/ml) comme contrôle positif pour la migration, avec les inhibiteurs RRed (20 μ M) ou RN (20 μ M), en présence de GSK seul (10 nM) ou en combinaison avec les inhibiteurs. À la fin du traitement, des photos ont été prises pour les analyses. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM du recouvrement relatif au contrôle de 7 expériences indépendantes et ont été analysées par un test de variance de type Anova ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

2. 2. 3. 3 Sécrétion de la cytokine IL-6 induite par l'activation de TRPV4

Par la suite, nous nous sommes concentrés sur la sécrétion de cytokines. Nous avons donc évalué la sécrétion d'interleukine 6 (IL-6) suite à un traitement au GSK. Les cellules MG-63 ont été traitées 24 h à des concentrations croissantes de GSK (GSK 0-10 nM). Nous avons par la suite mesuré la sécrétion d'IL-6 dans le milieu en effectuant un dosage immuno-enzymatique ELISA sur le surnageant prélevé. Une

stimulation dose-dépendante de la sécrétion d'IL-6 est observée dans la figure 2.9. La stimulation de la sécrétion d'IL-6 par les MG-63 suite à l'activation des TRPV4 est maximale à partir de 5 nM GSK.

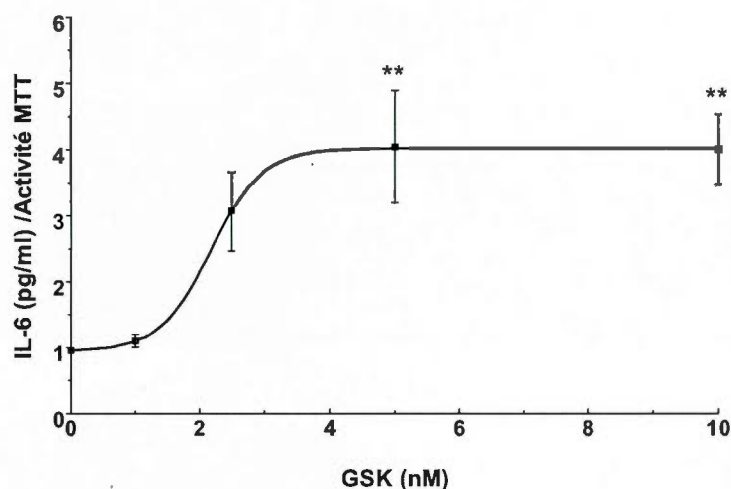


Figure 2.9: Quantification de la sécrétion d'interleukine 6. Les cellules MG-63, à 80% de confluence dans des plaques de 96 puits, ont été traitées avec différentes concentrations de GSK (0-10 nM) durant 24 h. Le surnageant a par la suite été prélevé, centrifugé à 2500 rpm et ensuite utilisé pour le dosage d'IL-6 par un test ELISA. Un essai MTT a aussi été effectué sur les cellules MG-63. La sécrétion d'IL-6 a été calculée par rapport à l'activité MTT des MG-63. Les résultats représentent les moyennes \pm SEM de 6 expériences évalués statistiquement par un test de variance 1-Way Anova (post-test : Turkey ** $p < 0.01$).

2. 2. 4 La différenciation des pré-ostéoblastes MC3T3

Les cellules pré-ostéoblastiques humaines MG-63 n'ont pas la capacité de se différencier en condition de culture *in vitro*. Nous avons donc choisi d'utiliser la lignée pré-ostéoblastique murine MC3T3 qui a la capacité de se différencier dans des conditions de culture *in vitro*. Nous avons traité les cellules MC3T3 avec un milieu

de différenciation contenant 50 µg/ml d'acide ascorbique et 5 mM de glycérol-2-phosphate en présence de concentrations croissantes de GSK durant 3 semaines. Nous avons effectué en parallèle un traitement similaire sur les cellules MC3T3 sans induction de la différenciation. Le milieu de traitement de différenciation a été remplacé par le milieu MEM. Ces deux conditions ont été utilisées dans différentes analyses présentées dans les sections suivantes.

2. 2. 4. 1 Expression des canaux TRPV4 dans les cellules MC3T3

Avant d'induire la différenciation des MC3T3, nous avons vérifié l'expression génique des canaux TRPV4 dans ces cellules murines. Nous avons effectué une analyse par RT-PCR à partir de l'ARN des MC3T3 isolé de cellules mises en culture. Les analyses par PCR ont été réalisées avec des amorces spécifiques au TRPV4 murin. Nous avons procédé ensuite à une migration des produits PCR sur gel d'agarose 2% puis nous avons révélé l'ADN amplifié sous UV. La figure 2.10 montre la présence d'une bande d'ADN amplifié à un poids attendu (361 pb) pour le transcrit de TRPV4.

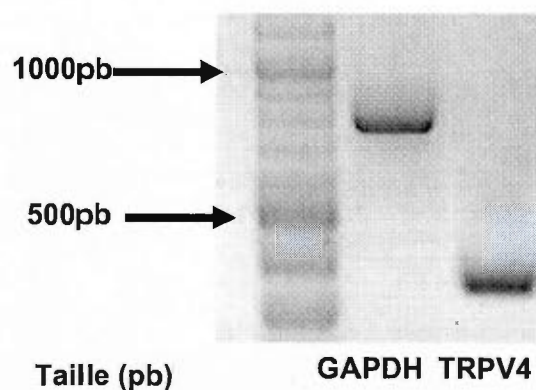


Figure 2.10 : Expression génique des canaux TRPV4 dans les ostéoblastes murins MC3T3. L'ADNc a été obtenu par une transcription inverse. Cet ADNc a été amplifié par PCR puis migré sur gel d'agarose 2%. Un amplicon de 361 pb est attendu. Le gène GAPDH a été utilisé comme gène de référence et la taille attendue de l'amplicon est de 789pb. La photo est représentative de 4 expériences.

2. 2. 4. 2 Effet du GSK sur l'activité mitochondriale des MC3T3

Nous avons aussi déterminé la viabilité des cellules MC3T3 suite à un traitement au GSK. Nous avons précédemment démontré que l'activation des canaux TRPV4 n'affecte pas l'activité MTT des cellules MG-63 à de faibles concentrations de GSK (figure 2.6). Les résultats obtenus avec les cellules MC3T3 sont similaires (figure 2.11). Les traitements des cellules MC3T3 à des concentrations de l'ordre du nanomolaire de GSK n'ont pas affecté la viabilité des cellules.

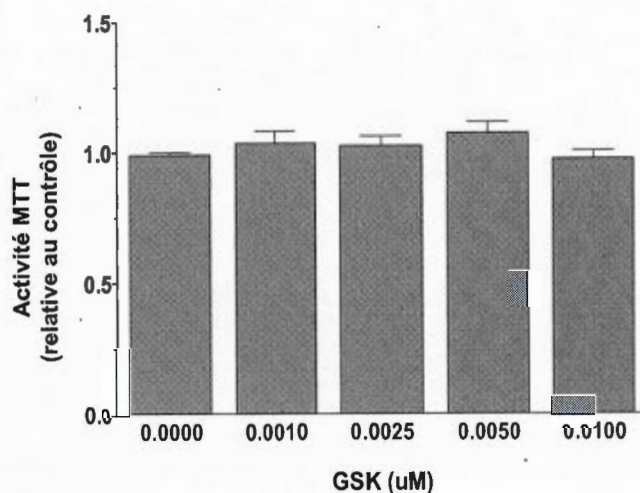


Figure 2.11 : Effet de l'activation de TRPV4 par le GSK sur l'activité MTT des cellules MC3T3. Les cellules MC3T3 ont été traitées durant 48 h avec des concentrations croissantes de GSK et des essais MTT ont été réalisés. La figure présente les moyennes \pm SEM de l'activité MTT relative au contrôle sans GSK de 4 expériences indépendantes.

2. 2. 4. 3 Effet d'un traitement prolongé avec le GSK sur l'activité MTT des MC3T3

L'activité MTT des cellules traitées durant 3 semaines au GSK dans un milieu de différenciation ou dans un milieu MEM a été analysée. Les essais MTT ont été effectués à la fin de chaque semaine de traitement. Les résultats pour chaque semaine sont représentés dans la figure 2.12. Dans un premier temps, pour les cellules traitées dans le milieu MEM en absence de GSK (0 nM) (Figure 2.13a), l'activité mitochondriale des MC3T3 pour les 3 semaines de traitement n'a pas été affectée. Cette non-variation de l'activité mitochondriale est aussi observée pour les cellules en

traitement de différenciation (figure 2.12b). L'analyse de chaque semaine individuellement n'indique pas non plus de variation significative de l'activité MTT. En effet, l'activité MTT de la semaine 2 et de la semaine 3 en présence de GSK 1 nM, 5 nM et 10 nM pour les cellules sous traitement de différenciation ou non est similaire à l'activité MTT de la semaine 1 à 0 nM GSK.

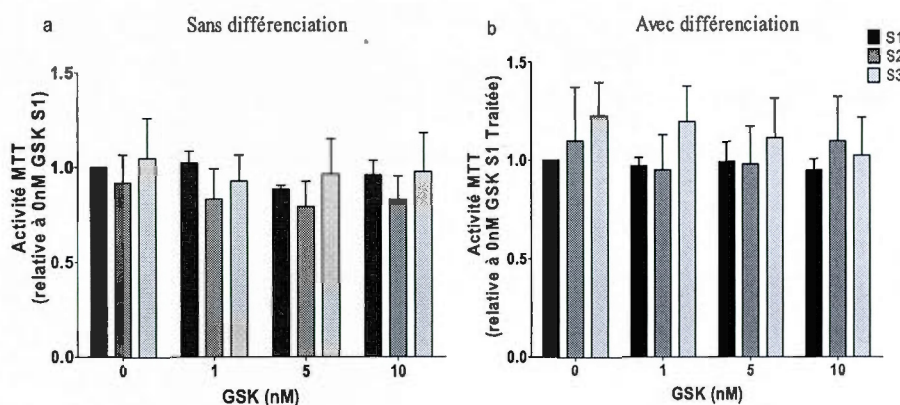


Figure 2.12 : Activité MTT des cellules MC3T3 suite à des traitements prolongés avec le GSK. Les cellules MC3T3, à 100% de confluence, ont été traitées durant une (S1), deux (S2) ou trois semaines (S3) en présence de GSK (0-10 nM) dans un milieu MEM sans traitement de différenciation (a) ou un milieu permettant la différenciation (b). À la fin de chaque semaine, un essai MTT a été réalisé sur un groupe de cellules. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM de l'activité MTT relative à la semaine 1 (S1) sans GSK de 3 à 4 expériences indépendantes.

2.2.4.4 Évaluation de la matrice de phosphate de calcium produite par les MC3T3

Les cellules MC3T3 ont été différenciées durant trois semaines en présence de différentes concentrations de GSK. Une coloration au rouge Alizarine a été réalisée à la fin de chaque semaine de traitement. Les résultats obtenus démontrent qu'il y a une

augmentation de la minéralisation pour les conditions en absence de GSK (figure 2.13). Le niveau de minéralisation déterminé par une coloration au rouge Alizarine passe de 1.44 (± 0.05) à la semaine 2 à 1.76 (± 0.27) à la semaine 3 pour la condition sans traitement de différenciation (figure 2.13a) et de 1.53 (± 0.13) à 2.11 (± 0.16) pour la semaine 2 et de la semaine 3 pour la condition avec traitement de différenciation (figure 2.13b). Toutefois, la présence de GSK n'a pas d'effet sur le niveau de coloration au rouge Alizarine.

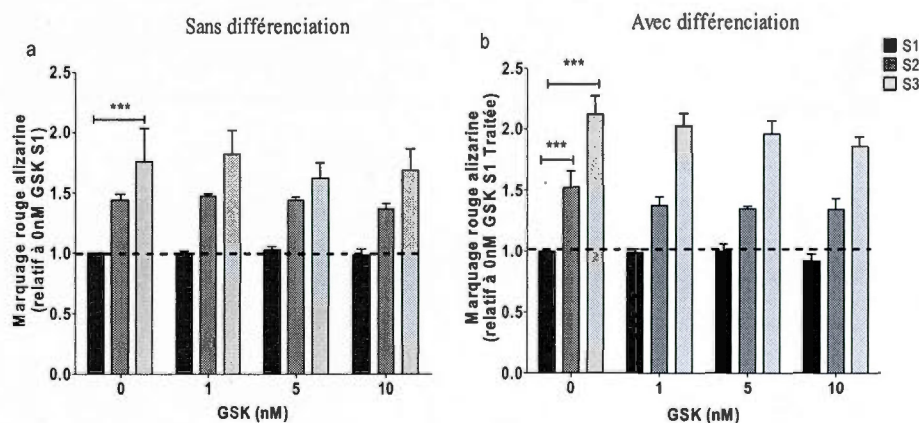


Figure 2.13 : Quantification de la minéralisation par coloration avec le rouge Alizarine suite à des traitements de différenciation en présence de GSK. Les cellules MC3T3 à 100 % de confluence ont été traitées durant une (S1), deux (S2) ou trois semaines (S3) en présence de GSK (0-10 nM) dans un milieu MEM sans traitement de différenciation (a) ou un milieu permettant la différenciation (b). A la fin du traitement, une coloration au rouge Alizarine a été effectuée. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de la coloration relative à la semaine 1 (S1) sans GSK de 3 à 5 expériences indépendantes (post-test : Bonferoni *** $p < 0.01$).

2. 2. 4. 5 Effet du GSK sur la synthèse de la phosphatase alcaline

Comme dans les expériences précédentes, la différenciation cellulaire en ostéoblastes matures a été induite sur des cellules MC3T3 durant 3 semaines. Un dosage de l'activité de la phosphatase a été réalisé à la fin du traitement sur les cellules traitées au GSK (0-10 nM) dans le milieu avec ou sans traitement de différenciation. Les résultats, normalisés à la quantité totale de protéines, montrent une augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline de 56% à la semaine 3 pour les cellules non-traitées à la vitamine C et la β GP en absence de GSK (figure 2.14a). Cette augmentation correspond à la différenciation spontanée des cellules MC3T3 après 3 semaines de culture. Pour les cellules induites en absence de GSK (figure 2.14b), il y a une augmentation de la phosphatase alcaline de 55 % pour la semaine 2 et de 98% pour la semaine 3. Lorsqu'on évalue l'effet de GSK par semaine de traitement, les résultats démontrent que GSK n'influence pas l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline dans les deux conditions (a et b). En effet, lorsque l'on compare les valeurs obtenues en présences de GSK à la condition sans GSK, il n'y a pas de différences significatives (figure 2.14).

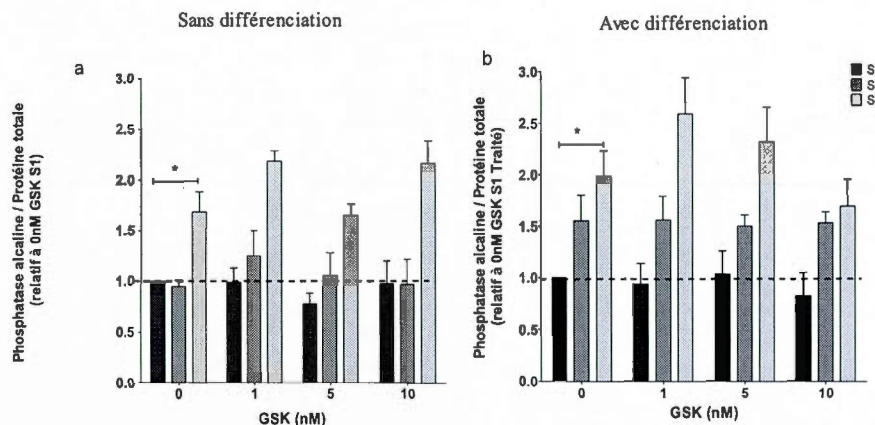


Figure 2.14 : Quantification de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline des cellules suite à des traitements prolongés avec le GSK. Les cellules MC3T3 ont été traitées à différentes concentrations de GSK (0-10nM) durant une (S1), deux (S2) ou trois semaines (S3) dans un milieu MEM sans traitement de différenciation (a) ou un milieu permettant la différenciation (b). À la fin des traitements, un dosage de l'activité de la phosphatase alcaline ainsi qu'un dosage de protéines totales ont été réalisés. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM de l'activité de la phosphatase alcaline relative à la semaine 1 (S1) sans GSK de 3 à 5 expériences indépendantes et ont été évaluées statistiquement par une analyse de variance 2-Way Anova (post-test : Bonferroni * $p < 0.1$).

CHAPITRE III :

DISCUSSION & CONCLUSION

3. 1 DISCUSSION

Les canaux TRPV4, par leur transport du calcium, sont à même de réguler plusieurs activités cellulaires. En effet, le calcium intracellulaire agit comme second messenger dans plusieurs fonctions cellulaires et participe à l'accomplissement de la synthèse de protéine jusqu'à la réplication de l'ADN et la prolifération des cellules. Bien que certaines études aient associées les canaux TRPV4 à la régulation de certaines fonctions cellulaires, leur expression dans les ostéoblastes reste à être confirmée et leurs rôles dans ces cellules ne sont pas connus. Cette étude consistait à étudier le rôle des canaux TRPV4 dans les ostéoblastes.

3. 1. 1 Expression génique des TRPV4 dans les MG-63

Pour cette étude, nous avons tout d'abord vérifié l'expression des canaux TRPV4 dans le modèle ostéoblastique MG-63. La présence de 2 bandes correspondant à l'amplification d'ADN en présence d'amorces spécifiques pour les canaux TRPV4 indique l'expression génique de TRPV4 dans les cellules MG-63. En effet, la bande obtenue présente une taille similaire à celle attendue pour les canaux TRPV4. Ces résultats correspondent aux données publiées précédemment par notre laboratoire (Abed *et al.*, 2009). Le produit PCR de 686 pb correspond aux variants 2 (NM_147204.2) et 3 (NM_001177433.1) et le produit PCR de 868 pb correspond aux variants 1 (NM_021625.4) 4 (NM_001177431.1) et 5 (NM_001177428.1). l'exon 7 est absent dans les variants 2 et 3 et celui-ci code pour un domaine Ankyrin

et un site de phosphorylation tyrosine (Liedtke, *et al.*, 2000). Aucune autre publication n'a démontré l'expression de TRPV4 dans les ostéoblastes humains. Par contre la littérature rapporte son expression chez les ostéoblastes murins (Mizoguchi *et al.*, 2008). Nous nous sommes intéressés par la suite à l'expression des autres membres des canaux TRPV dans les cellules MG-63. L'expression de plus d'un type de canal TRPV a été démontrée à mainte reprise dans d'autres modèles cellulaires (Vennekens *et al.*, 2008). Il est possible de voir l'apparition d'hétérotétramères formés de sous-unités d'un type de TRPV (par exemple TRPV2) et de sous-unités d'un autre type (par exemple TRPV4). Ainsi, l'activation de ce canal impliquerait les caractéristiques communes des 2 types de canaux TRPV. Ceci rendrait difficile l'identification de l'action spécifique d'un canal dans la cellule. Parmi les autres membres de la famille des canaux TRPV, nos résultats indiquent que TRPV2 est aussi exprimé dans les cellules MG-63. N'ayant pas détecté de transcrite pour les autres TRPV, ceux-ci sont absents ou à des niveaux faibles ce qui nous laisse croire à l'absence ou à des niveaux faibles des protéines. Bien que nos résultats indiquent la présence de transcrite pour les canaux TRPV4, ils ne confirment cependant pas la présence d'une protéine fonctionnelle.

3. 1. 2 Induction d'un influx calcique par l'activation des canaux TRPV4

Après avoir confirmé l'expression génique des canaux TRPV4 dans notre modèle d'ostéoblastes, nous avons voulu déterminer l'expression protéique des canaux TRPV4 dans les cellules MG-63. Toutefois, il n'a pas été possible de déterminer l'expression protéique de TRPV4 par immunobuvardage considérant le manque de spécificité des anticorps utilisés. Nous avons donc utilisé la microscopie confocale pour évaluer la présence de protéines fonctionnelles. En utilisant un activateur sélectif des canaux TRPV4, le GSK, nous avons observé un influx calcique induit par le GSK suite à l'ajout de calcium au milieu d'incubation. Il est à noter qu'au départ, l'ajout de

GSK a été fait dans un milieu sans calcium afin de déterminer sa capacité à induire une mobilisation du calcium du RE. L'absence d'une mobilisation du calcium du RE en présence de GSK indique que cet agent n'a pas d'effet sur la voie impliquant la PLC et l'IP₃. Suite à l'ajout du calcium dans le milieu d'incubation, une augmentation de la fluorescence a été enregistrée. Cette fluorescence représente l'influx du calcium du milieu extracellulaire vers le cytosol cellulaire. L'influx calcique obtenu en présence de GSK permet de confirmer la localisation de canaux TRPV4 fonctionnels au niveau de la membrane cellulaire. Le passage du calcium se fait selon le gradient électrochimique, car la concentration intracellulaire en calcium (100 nM) est extrêmement plus faible que celle du milieu extracellulaire (~2 mM) (Clapham, 2007). Il a été rapporté que les canaux TRPV4 démontrent un ratio de perméabilité au calcium et au sodium (P_{Ca}/P_{Na}), entre 6 et 10, ce qui est environ 10 fois plus faible que celui pour les canaux TRPV5 et TRPV6 (Everaerts *et al.*, 2010; Plant et Strotmann, 2007). Ainsi, les TRPV4 sont des canaux non-sélectifs, ce qui permet le passage du calcium et aussi d'autres cations tels le sodium. Toutefois, l'entrée du sodium dans des cellules non-excitables comme les ostéoblastes ne permet pas d'induire une dépolarisation membranaire suffisante permettant l'ouverture de canaux activés par le voltage et l'entrée de calcium (Mahaut-Smith *et al.*, 1999). L'influx possible du sodium n'affecterait donc en rien l'influx du calcium dans la cellule. Ainsi, la non-sélectivité ionique des canaux TRPV4 n'affecte pas l'influx enregistré en présence de GSK.

Nos résultats indiquent aussi que l'effet du GSK sur l'influx de calcium dépend de la concentration. L'influx de calcium induit par le GSK augmente en fonction de la concentration de GSK utilisée. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Jin *et al.*, (Jin *et al.*, 2011). Dans leur étude, l'augmentation maximale du calcium intracellulaire était atteinte à 10 nM. À partir de cette concentration, la variation en calcium est restée stable avec l'augmentation de la concentration de GSK. Nous

avons aussi observé que des concentrations supérieures à 10 nM n'augmentaient pas davantage les niveaux de fluorescence. Bien que l'utilisation d'un activateur sélectif des canaux TRPV4 permette d'obtenir un influx, on ne peut pas exclure l'implication d'autres canaux TRP. Plus spécifiquement, des canaux TRPV2 pourraient être impliqués puisque nos résultats indiquent que les cellules MG-63 expriment aussi les canaux TRPV2.

3. 1. 2. 1 GSK induit un influx en activant TRPV4

Afin de confirmer que l'influx observé avec le GSK provient de l'activation des canaux TRPV4, l'utilisation de bloqueurs sélectifs à ces canaux a été nécessaire. Le RRed, un inhibiteur sélectif des canaux TRPV, a tout d'abord été utilisé (Vriens *et al.*, 2009). Dans cette expérience, l'incubation avec le RRed s'est effectuée 10 minutes avant l'ajout du GSK et l'inhibition est totale autant pour GSK 1nM que GSK 10nM. La sélectivité du RRed pour les canaux TRPV a été démontrée ici. L'inhibition par le RRed démontre que l'influx obtenu par le GSK provient bien des canaux de la famille des TRPV. Cependant comme nous avons présenté ci-dessus, les canaux TRPV2 sont aussi exprimés dans les cellules MG-63.

Nous avons, pour cela, utilisé le RN 1734, un inhibiteur reconnu comme étant sélectif pour les canaux TRPV4 (Vincent *et al.*, 2009). Lorsque les cellules MG-63 ont été incubées avec le RN 1734, l'influx initialement obtenu avec le GSK à 10 nM a été inhibé à 87%. Lorsque nous avons diminué la concentration de GSK à 1 nM, l'inhibition de l'influx a été totale en présence de RN 1734. Une explication possible pour l'inhibition incomplète en présence de RN 1734 est la différence d'affinité de l'inhibiteur et de l'activateur pour les canaux TRPV4. Ainsi, lorsqu'une concentration plus faible de GSK a été utilisée, l'inhibition en présence de RN 1734 a été totale. Le même principe serait visible si, à la place de la diminution de la concentration du GSK, la concentration de l'inhibiteur augmentait. Nos résultats indiquent que le GSK

a une affinité et une efficacité supérieures au RN 1734 pour les canaux TRPV4. Ainsi, nos résultats confirment que l'influx calcique obtenu avec le GSK est dû à l'activation des canaux TRPV4.

Nous avons démontré que les canaux TRPV2 seraient aussi exprimés dans les ostéoblastes. Nous avons décidé de vérifier si l'influx induit par le GSK était dû à une activation des canaux TRPV2. Le GSK n'est pas reconnu comme étant un activateur des canaux TRPV2. Toutefois, nous ne pouvons exclure l'existence d'hétérotétramère TRPV2-TRPV4 (Vennekens *et al.*, 2008), bien que de tels canaux n'aient pas été observés. Nous avons donc effectué des mesures de calcium intracellulaire en incubant les cellules avec le tranilast, un inhibiteur reconnu des canaux TRPV2 (Hisanaga *et al.*, 2009). L'influx calcique induit par le GSK n'a pas été inhibé avec le tranilast, ce qui indique que les canaux TRPV2 ne sont pas impliqués dans l'influx généré par le GSK.

Une étude publiée par notre laboratoire a démontré que les TRPC seraient aussi une autre sous-famille de canaux TRP exprimée dans les ostéoblastes (Abed *et al.*, 2009). Afin d'exclure ces canaux TRPC, nous avons réalisé des expériences en utilisant le gadolinium, un inhibiteur des TRPC (Zhou *et al.*, 2008). Nos résultats indiquent que l'influx induit par le GSK n'a pas été inhibé en présence du gadolinium, permettant ainsi d'exclure l'implication des TRPC dans l'influx induit par le GSK.

3. 1. 2. 2 De faibles concentrations de GSK n'ont pas d'effet cytotoxique dans les MG-63

Après avoir démontré l'expression génique et protéique des canaux TRPV4 dans les cellules MG-63, des études de leurs fonctions dans ces cellules ont été effectuées. Avant de débiter les études fonctionnelles et puisque les mesures de calcium n'impliquaient que des expositions des cellules au GSK que de quelques minutes,

nous avons déterminé l'effet d'une incubation prolongée des cellules au GSK. Pour débiter, une évaluation de l'effet de l'activation des canaux TRPV4 par le GSK sur la prolifération et la viabilité cellulaire a été effectuée. Nous avons mesuré l'activité MTT des MG-63 suite à un traitement de 48 h à des concentrations croissantes de GSK. Le GSK a un effet cytotoxique sur les cellules MG-63 seulement à partir de 20 μ M. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Zaninetti *et al.* (2011). Ces derniers recommandent une utilisation du GSK comme ligand des canaux TRPV4 à des nM. Leur suggestion est basée sur l'observation d'un taux de survie de 35% des cellules endothéliales à 100 nM GSK suite à un traitement de 24 h. Leur modèle cellulaire, des cellules endothéliales, étant différent du nôtre, des cellules osseuses, nous avons donc voulu vérifier si nous aurions des résultats similaires. Leurs études relatent une mortalité cellulaire de 65% à 100 nM d'un traitement de 24 h tandis que notre expérience présente une mortalité de 35% à 20 μ M pour un traitement de 48 h. Malgré les divergences au niveau de la méthodologie utilisée ainsi qu'au niveau des résultats obtenus, la mortalité est visible aux concentrations supérieures aux nanomolaires. D'autres publications ont aussi suggéré l'utilisation du GSK à des concentrations faibles pour une utilisation en lien avec les TRPV4 (Earley, 2010; Willette *et al.*, 2008). À partir de ces observations, nous avons donc décidé d'utiliser, dans nos expériences suivantes, le GSK à des concentrations maximales de 10nM.

3. 1. 2. 3 L'activation des canaux TRPV4 régule la migration cellulaire

Connaissant maintenant l'intervalle de concentrations de GSK ne causant pas de mortalité cellulaire et afin de déterminer les fonctions des canaux TRPV4 dans les ostéoblastes, nous avons entrepris des expériences de migration cellulaire. Nous nous sommes inspirés de précédents travaux qui rapportaient que l'activation des canaux TRPV4 inhibait la migration des cellules neuronales (Zaninetti *et al.*, 2011). La migration a été évaluée sur 16h en présence de GSK ainsi que des inhibiteurs RRed et

RN 1734. Une inhibition de la migration des cellules MG-63 est observée en présence de GSK. Nous avons déterminé précédemment que l'activation des canaux TRPV4 par le GSK n'affecte pas la prolifération et la viabilité cellulaire. À partir de ce point, nous sommes confiants que durant l'essai de migration, il y n'y a pas eu de mortalité cellulaire et que le GSK inhibe la migration cellulaire. Il est possible de voir sur la même figure que le RRed seul n'a aucun effet sur la migration cellulaire. Par contre, lorsque mis en combinaison avec le GSK, il renverse l'inhibition de la migration de celui-ci. Ces résultats corroborent ceux obtenus par Zaninetti *et al.* (2011). Ils ont observé une inhibition de la migration de cellules neuronales en présence de GSK. Semblable à nos observations, l'inhibition a été renversée en présence de RRed. Lorsque nous avons réalisé l'expérience avec le RN 1734 nous avons aussi observé un renversement de l'inhibition. Toutefois, il n'est pas aussi prononcé que celui observé avec le RRed. Ceci est dû en partie à l'affinité du GSK et du RN 1734 pour les canaux TRPV4. Nous avons démontré précédemment par l'étude de l'inhibition de l'influx par le RN qu'une diminution de la concentration du GSK (de 10 nM à 1 nM) permettrait d'inhiber l'influx totalement. Puisque l'inhibition de la migration observée avec 10 mM de GSK est de 12%, nous n'avons pas réalisé cette expérience avec une concentration plus faible de GSK considérant qu'une inhibition plus faible serait observée avec une concentration inférieure de GSK. Ceci nous ne nous aurait pas permis de mettre en évidence l'effet antagoniste du RN démontré par les mesures de fluorescence en présence d'une faible concentration de GSK. Maintenant, l'explication justifiant l'effet des canaux TRPV4 sur la migration cellulaire pourrait être en lien avec l'interaction des canaux TRPV4 avec le cytosquelette. Selon Zaninetti *et al.* (2011), l'activation des canaux TRPV4 occasionnerait une rétraction des lamellipodes. Il a été suggéré que les canaux TRPV4 interagiraient directement avec les filaments d'actine et les microtubules (Goswami *et al.*, 2010). Cette interaction s'effectuerait par l'extrémité C-terminale des canaux TRPV4. Une étude plus approfondie de l'implication des canaux TRPV4 au niveau du cytosquelette de la cellule, des protéines d'adhésion et de la migration aurait été intéressante. En effet,

d'autres publications ont démontré l'implication des canaux TRPV4 dans différentes structures du cytosquelette. Par exemple, les canaux TRPV4 seraient aussi impliqués au niveau de la vitesse de battements des cils des cellules endothéliales (Lorenzo *et al.*, 2008). Ils participeraient en plus aux changements morphologiques observés chez les cellules hépatocytaires (Waning *et al.*, 2007). La migration cellulaire implique différentes forces de déplacement et les structures contrôlant ces forces sont nombreuses (Lauffenburger et Horwitz, 1996). L'utilisation d'une vidéo-microscopie serait aussi une autre méthode très intéressante pour étudier la migration cellulaire. La vitesse de déplacement des ostéoblastes, les différents mouvements effectués par la cellule ainsi que la trajectoire effectuée par les cellules lors de leur déplacement pourraient être évalués. Ces paramètres déterminent entre autres les structures cellulaires employées par la cellule lors de la migration (Lauffenburger et Horwitz, 1996). Il est aussi à noter que différentes étapes interviennent lors de la migration d'une cellule (Ridley *et al.*, 2003). En premier lieu, la cellule va se polariser et ainsi distribuer certains complexes protéiques dans le cytoplasme selon la direction de la migration. Ainsi, la protéine Cdc42 se localise à un pôle et va ainsi dicter la direction (Ridley *et al.*, 2003). À ce pôle, il y aura la formation d'extensions de la membrane plasmique sous l'influence d'une réorganisation et une polymérisation cytoplasmiques de microtubules. De nouveaux points de contact vont alors se former sous l'influence de la formation dans le cytoplasme de filaments d'actine et de l'interaction des intégrines de surface avec la matrice extracellulaire, ce qui va stabiliser les extensions de la membrane et l'adhésion des cellules (Ridley *et al.*, 2003). L'établissement des nouvelles structures de microtubules et de filaments d'actine fait intervenir une multitude de protéines accessoires. Il est à noter que le calcium est impliqué dans plusieurs de ces étapes. Par exemple, des concentrations élevées de calcium favorisent l'association de gelsolin, une protéine qui agit comme une coiffe à l'extrémité des filaments d'actine et ainsi bloque son élongation, ce qui prévient la polymérisation des filaments d'actine (Lauffenburger et Horwitz, 1996). L'implication des canaux TRPV4 dans la migration des ostéoblastes serait peut être

lié à une étape spécifique de la migration ce qui inhiberait le processus de migration de la cellule. Les différentes étapes sont autant importantes les unes des autres.

3. 1. 2. 4 L'activation des canaux TRPV4 régule la sécrétion d'interleukine 6

Par la suite, nous avons évalué l'implication de l'activité des canaux TRPV4 dans la sécrétion d'interleukine-6. Il a été démontré qu'au niveau des cellules intestinales, les canaux TRPV4 régulaient la sécrétion de cytokines (D'Aldebert *et al.*, 2011). Un essai de type ELISA a donc été réalisé sur les surnageants de culture suite à un traitement de 24 h avec différentes concentrations de GSK. Les résultats démontrent une stimulation dose-dépendante de la sécrétion d'IL-6 par les ostéoblastes en présence de GSK. Cette augmentation d'IL-6 dans le milieu peut provenir d'une augmentation de la sécrétion et de l'augmentation de la transcription du gène. Présentement, nous ne sommes pas en mesure de statuer sur l'implication de GSK dans la stimulation de la transcription du gène de l'IL-6. À notre connaissance, aucune étude ne rapporte que le GSK puisse activer le facteur nucléaire NFκB, un facteur essentiel à la stimulation de la transcription du gène de l'IL-6. L'ajout d'inhibiteur de du facteur NFκB lors du traitement avec GSK aurait permis d'évaluer la contribution de la transcription dans l'augmentation d'IL-6 dans le milieu.

L'IL-6 est impliquée dans le processus de remodelage osseux. Elle est en fait sécrétée par les ostéoblastes lors du recrutement et de la différenciation des ostéoclastes (Manolagas, 2000). Il a été démontré cependant que l'IL-6 serait sécrétée par les ostéoblastes suite à une mobilisation du calcium intracellulaire (Bradford *et al.*, 2000). Suite à une stimulation d'un récepteur couplé à une protéine G, il y aurait activation de la phospholipase C qui induirait le clivage de PIP₂ en DAG et IP₃. L'IP₃ se lierait à son récepteur IP₃R au niveau du RE ce qui induirait la libération du calcium qui stimulerait par la suite la sécrétion d'IL-6 (Clapham, 2007). Il n'y a pas encore eu

d'étude rapportant l'implication d'un influx calcique dans la sécrétion d'interleukine. Toutefois, le calcium est reconnu pour induire la fusion des vésicules intracellulaires avec la membrane plasmique et permettre ainsi la libération de facteurs par exocytose (Troade *et al.*, 1998). Ce processus impliquerait différentes protéines tels la protéine soluble d'attachement au facteur sensible à la N-éthylmaleimide (SNARE) et Munc13, une autre protéine qui se joint au complexe de translocation/fusion des vésicules (Barclay *et al.*, 2005). Le calcium induirait le changement de conformation des protéines au sein du complexe ce qui mènerait à la translocation de la vésicule formée vers la membrane plasmique. La concentration intracellulaire faciliterait la fusion de la membrane vésiculaire à celle de la cellule suivie d'une expulsion de son contenu dans le milieu extracellulaire (Barclay *et al.*, 2005; Coorssen *et al.*, 2003). Ces mécanismes pourraient être activés par l'influx de calcium induit par le GSK. Il serait, toutefois, intéressant d'étudier l'implication de TRPV4 dans la stimulation de la sécrétion d'IL-6 par le GSK en utilisant le RN 1734.

3. 1. 2. 5 Différenciation des ostéoblastes

La capacité de différenciation des ostéoblastes leur permet de produire une matrice extracellulaire et d'en assurer la minéralisation. La production de cette matrice est une caractéristique unique des ostéoblastes. La régulation de la différenciation cellulaire par les canaux TRPV4 a été démontré dans les chondrocytes (Muramatsu *et al.*, 2007). En effet, les auteurs rapportent que l'activation de TRPV4 stimule la synthèse du facteur de transcription SOX9, un facteur central dans la différenciation des chondrocytes. L'augmentation de l'expression de SOX9 suite à l'activation des canaux TRPV4 est associée à l'apparition des marqueurs de différenciation des chondrocytes tels le collagène de type II et les glycosaminoglycanes. Ainsi, nous avons voulu étudier l'implication d'une activation des canaux TRPV4 dans la

différenciation des ostéoblastes. Cependant, le modèle cellulaire utilisé depuis le début de cette étude, soit la lignée ostéoblastique humaine MG-63, ne nous permettait pas d'entreprendre cette étude puisque les cellules MG-63 n'ont pas la capacité de se différencier *in vitro*. De ce fait, nous avons décidé d'utiliser pour les expériences suivantes la lignée ostéoblastique murine MC3T3 dont la différenciation peut être stimulée *in vitro*.

Avant de débiter la différenciation des cellules MC3T3, nous nous sommes assurés que les canaux TRPV4 étaient aussi exprimés dans ces cellules. Nous avons donc déterminé l'expression génique des canaux TRPV4 murins par RT-PCR selon le même procédé utilisé pour les cellules humaines MG-63. La présence d'un transcrit du gène des canaux TRPV4 dans les MC3T3 a été confirmée par RT-PCR.

Nous avons aussi déterminé l'effet du GSK sur la prolifération et la viabilité des cellules MC3T3. Comme les résultats obtenus avec les MG-63, nous n'avons observé aucun effet du GSK sur l'activité MTT lorsque les cellules MC3T3 ont été traitées au GSK (0-100 nM). Cela nous permet d'affirmer que l'activation des canaux TRPV4, après 24 heures de traitement au GSK, n'affectent pas la prolifération ou la viabilité des cellules MC3T3.

Nous avons induit la différenciation des cellules MC3T3 en traitant les cellules avec la vitamine C et le β -glycérophosphate (Vitamine C et β GP) (Lin et Hankenson, 2011). Suite à la différenciation des cellules MC3T3, nous avons mesuré l'activité MTT des MC3T3 pour les 3 semaines de traitement. Un traitement prolongé des cellules avec le GSK n'a eu aucun effet sur l'activité MTT.

Par la suite, nous avons évalué l'effet du GSK sur l'activité de la phosphatase alcaline, un marqueur de la différenciation des ostéoblastes. Les cellules MC3T3, en absence de GSK, présentent une augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline en

fonction du temps de culture et d'un traitement de différenciation. Dans les cellules induites, cette augmentation débute dès la semaine 2. Comme mentionné précédemment, la vitamine C et la β GP sont utilisés pour stimuler davantage la différenciation. Cette stimulation favorise une augmentation de la synthèse du marqueur dès la semaine 2 comparativement à une stimulation visible seulement à la semaine 3 pour les cellules qui n'ont pas été stimulées. Ces résultats concordent avec ceux de la littérature. En effet, une plus grande activité de la phosphatase alcaline est observée 10 à 14 jours suivant le traitement avec la vitamine C et β GP (Beck, Jr. *et al.*, 1998; Malaval *et al.*, 1999). Lorsqu'on observe maintenant l'effet du traitement de GSK sur l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline, aucun changement n'est remarqué. L'activité de la phosphatase alcaline obtenue en présence de GSK est maintenue autant dans les cellules non traitées que celles où la différenciation a été induite. Nous pouvons donc conclure que l'activation des canaux TRPV4 n'a aucun effet sur l'activité de la phosphatase alcaline comme marqueur de la différenciation des ostéoblastes.

Afin de déterminer l'effet du GSK sur la différenciation ostéoblastique, nous avons déterminé le niveau de formation d'une matrice minéralisée par une coloration au rouge Alizarine sur des cellules MC3T3 traitées à des concentrations croissantes de GSK en présence ou non d'un milieu stimulant la différenciation durant 3 semaines. L'essai au rouge alizarine permet de marquer les dépôts de calcium de la matrice extracellulaire (Beck, Jr. *et al.*, 1998). Nous avons observé une augmentation de la minéralisation de la matrice avec les cellules MC3T3 en fonction du temps de culture et du traitement de différenciation. C'est le phénomène caractéristique de la différenciation des cellules ostéoblastiques. Une observation des résultats en présence de GSK permet d'affirmer que GSK n'a aucun effet sur la minéralisation de la matrice produite par les cellules MC3T3. En effet, l'augmentation hebdomadaire observée ne varie pas avec une augmentation de la concentration de GSK autant pour

les cellules induites ou non. Nos résultats nous laissent croire que l'activation des canaux TRPV4 n'influence pas le processus de différenciation ostéoblastique.

En résumé, nos résultats indiquent que les canaux TRPV4 sont exprimés dans les ostéoblastes humains MG-63 et murins MC3T3. Nous avons démontré que l'activité de ces canaux régule la sécrétion de l'IL-6 et la migration cellulaire. Cependant, le mécanisme œuvrant dans cette régulation est encore à déterminer.

CONCLUSION

Le but de cette étude était de déterminer le rôle des canaux calciques TRPV4 dans les ostéoblastes. Nos résultats indiquent que l'activation des canaux TRPV4 est associée à un influx de calcium qui stimule la sécrétion d'IL-6 et diminue la migration des cellules MG-63. Cet influx n'influence ni la prolifération, ni la viabilité de ces cellules, et n'a aucun effet sur la différenciation ostéoblastique des cellules MC3T3.

Ces résultats ne sont qu'un début dans la compréhension du rôle de TRPV4 dans les ostéoblastes. L'implication des canaux TRPV4 dans la régulation de la migration des ostéoblastes pourrait aider à mieux comprendre certaines maladies osseuses sachant que les ostéoblastes régulent le remodelage osseux responsable du maintien du tissu osseux. Considérant que la migration d'une cellule implique plusieurs étapes, l'inhibition de ce processus lors de l'activation des canaux TRPV4 ne permet pas de se positionner face à l'impact positif ou néfaste de cette inhibition dans l'ensemble des étapes du remodelage osseux. La compréhension des rôles que jouent les TRPV4 dans la sécrétion de cytokines n'est pas aussi claire que l'est la migration. Le rôle reconnu de l'IL-6 au niveau de l'inflammation et des maladies inflammatoires laisse croire qu'une augmentation de sa sécrétion n'aurait pas un effet bénéfique sur la régulation du remodelage osseux. Il aurait été intéressant d'effectuer des expériences avec des cellules n'exprimant pas les canaux TRPV4 afin de confirmer son implication dans la migration cellulaire et la sécrétion d'IL-6.

En résumé, nos travaux ont permis d'associer les canaux TRPV4 à certaines fonctions ostéoblastiques et ainsi à mieux comprendre la régulation de l'activité des ostéoblastes. Notre étude est un pas supplémentaire vers la compréhension du remodelage osseux, visant à offrir des stratégies de prévention et de traitement de l'ostéoporose.

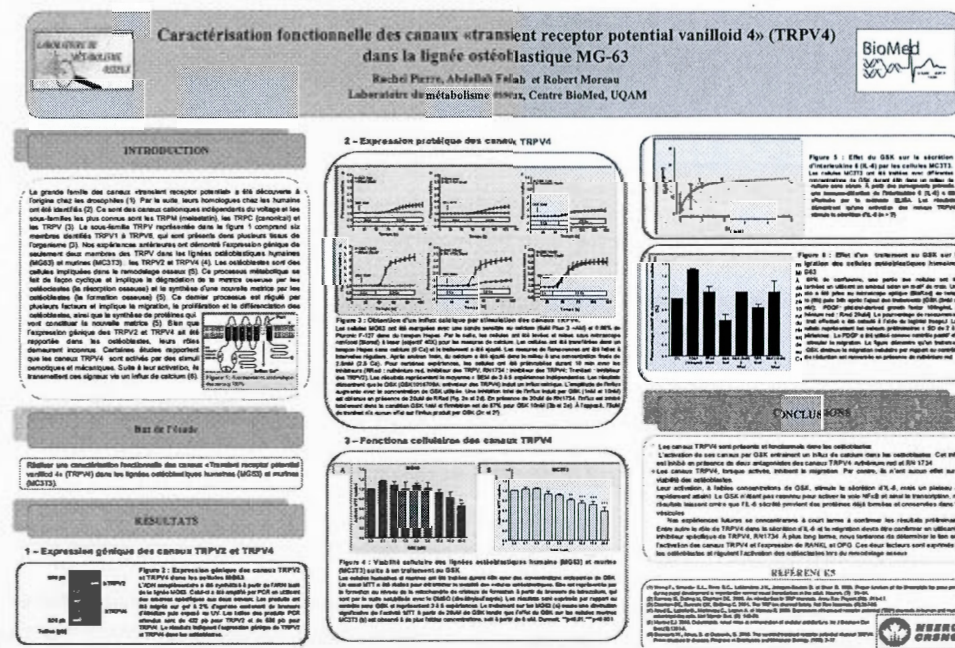
ANNEXE

COMMUNICATION EN LIEN AVEC LE SUJET D'ÉTUDE

Colloque BioMed, Université du Québec À Montréal, Avril 2012

Caractérisation des canaux «Transient Receptor Potential Vanilloid 4» (TRPV4) dans la lignée ostéoblastique MG-63

Rachel Pierre, Abdallah Fallah et Robert Moreau



BIBLIOGRAPHIE

- Abed,E., Labelle,D., Martineau,C., Loghin,A., & Moreau,R. (2009). Expression of transient receptor potential (TRP) channels in human and murine osteoblast-like cells. *Mol.Membr.Biol.*, 26(3), 146-158.
- Barclay,J.W., Morgan,A., & Burgoyne,R.D. (2005). Calcium-dependent regulation of exocytosis. *Cell Calcium*, 38(3-4), 343-353.
- Beck,G.R., Jr., Sullivan,E.C., Moran,E., & Zerler,B. (1998). Relationship between alkaline phosphatase levels, osteopontin expression, and mineralization in differentiating MC3T3-E1 osteoblasts. *J.Cell Biochem.*, 68(2), 269-280.
- Benayahu,D., Shur,I., Marom,R., Meller,I., & Issakov,J. (2001). Cellular and molecular properties associated with osteosarcoma cells. *J.Cell Biochem.*, 84(1), 108-114.
- Berridge,M.J., Lipp,P., & Bootman,M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 1(1), 11-21.
- Billiau,A., Edy,V.G., Heremans,H., Van Damme,J., Desmyter,J., Georgiades,J.A., & De Somer,P. (1977). Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 12(1), 11-15.
- Blair,H.C., Schlesinger,P.H., Huang,C.L., & Zaidi,M. (2007). Calcium signalling and calcium transport in bone disease. *Subcell.Biochem.*, 45, 539-562.
- Bradford,P.G., Maglich,J.M., & Kirkwood,K.L. (2000). IL-1 beta increases type 1 inositol trisphosphate receptor expression and IL-6 secretory capacity in osteoblastic cell cultures. *Mol.Cell Biol.Res.Comm.*, 3(2), 73-75.
- Brandi,M.L. (2009). Microarchitecture, the key to bone quality. *Rheumatology.(Oxford)*, 48 Suppl 4, iv3-iv8.
- Caterina,M.J., Leffler,A., Malmberg,A.B., Martin,W.J., Trafton,J., Petersen-Zeitz,K.R., Koltzenburg,M., Basbaum,A.I., & Julius,D. (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*, 288(5464), 306-313.

Clapham,D.E. (2007). Calcium signaling. *Cell*, 131(6), 1047-1058.

Clapham,D.E., Montell,C., Schultz,G., & Julius,D. (2003). International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels. *Pharmacol.Rev.*, 55(4), 591-596.

Clarke,B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clin.J.Am.Soc.Nephrol.*, 3 Suppl 3, S131-S139.

Coorssen,J.R., Blank,P.S., Albertorio,F., Bezrukov,L., Kolosova,I., Chen,X., Backlund,P.S., Jr., & Zimmerberg,J. (2003). Regulated secretion: SNARE density, vesicle fusion and calcium dependence. *J.Cell Sci.*, 116(Pt 10), 2087-2097.

Cosens, D. J. et Manning, A. (1969). Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature*. 224(5216), 285-287.

Crockett,J.C., Rogers,M.J., Coxon,F.P., Hocking,L.J., & Helfrich,M.H. (2011). Bone remodelling at a glance. *J. Cell Sci.*, 124(Pt 7), 991-998.

D'Aldebert,E., Cenac,N., Rousset,P., Martin,L., Rolland,C., Chapman,K., Selves,J., Alric,L., Vinel,J.P., & Vergnolle,N. (2011). Transient receptor potential vanilloid 4 activated inflammatory signals by intestinal epithelial cells and colitis in mice. *Gastroenterology*, 140(1), 275-285.

Declercq,H., Van,d., V, De Maeyer,E., Verbeeck,R., Schacht,E., De Ridder,L., & Cornelissen,M. (2004). Isolation, proliferation and differentiation of osteoblastic cells to study cell/biomaterial interactions: comparison of different isolation techniques and source. *Biomaterials*, 25(5), 757-768.

Donley,G.E. & Fitzpatrick,L.A. (1998). Noncollagenous matrix proteins controlling mineralization; possible role in pathologic calcification of vascular tissue. *Trends Cardiovasc.Med.*, 8(5), 199-206.

Downey,P.A. & Siegel,M.I. (2006). Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Phys.Ther.*, 86(1), 77-91.

Earley,S. (2010). Vanilloid and melastatin transient receptor potential channels in vascular smooth muscle. *Microcirculation.*, 17(4), 237-249.

Everaerts,W., Nilius,B., & Owsianik,G. (2010). The vanilloid transient receptor potential channel TRPV4: from structure to disease. *Prog.Biophys.Mol.Biol.* 2010.Sep.;103.(1):2-17.Epub.2009.Oct.14.,(1:2-17), Epub.

Feldman,D. (1999). Vitamin D, parathyroid hormone, and calcium: a complex regulatory network. *Am.J.Med.*, 107(6), 637-639.

Goswami,C., Kuhn,J., Heppenstall,P.A., & Hucho,T. (2010). Importance of non-selective cation channel TRPV4 interaction with cytoskeleton and their reciprocal regulations in cultured cells. *PLoS.One.*, 5(7), e11654.

Hadjidakis,D.J. & Androulakis,I.I. (2006). Bone remodeling. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 1092, 385-396.

Hamed,E., Jasiuk,I., Yoo,A., Lee,Y., & Liszka,T. (2012). Multi-scale modelling of elastic moduli of trabecular bone. *J.R.Soc.Interface*, 9(72), 1654-1673.

Hisanaga,E., Nagasawa,M., Ueki,K., Kulkarni,R.N., Mori,M., & Kojima,I. (2009). Regulation of calcium-permeable TRPV2 channel by insulin in pancreatic beta-cells. *Diabetes.* 2009.Jan.;58.(1):174.-84.Epub.2008.Nov.4.,(1:174-84), Epub.

Jin,M., Wu,Z., Chen,L., Jaimes,J., Collins,D., Walters,E.T., & O'Neil,R.G. (2011). Determinants of TRPV4 activity following selective activation by small molecule agonist GSK1016790A. *PLoS.One.*, 6(2), e16713.

Kahl,C.R. & Means,A.R. (2003). Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. *Endocr.Rev.*, 24(6), 719-736.

Katagiri,T. & Takahashi,N. (2002). Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis.*, 8(3), 147-159.

Kular,J., Tickner,J., Chim,S.M., & Xu,J. (2012). An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clin.Biochem.*, 45(12), 863-873.

Lauffenburger,D.A. & Horwitz,A.F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, 84(3), 359-369.

Lian, J.B., Stein, G.S., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Hassan, M.Q., Gaur, T., & Zhang, Y. (2012). MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nat.Rev.Endocrinol.*, 8(4), 212-227.

Lieben, L. & Carmeliet, G. (2012). The Involvement of TRP Channels in Bone Homeostasis. *Front Endocrinol.(Lausanne)*, 3, 99.

Liedtke, W., Choe, Y., Marti-Renom, M. A., Bell, A. M., Denis, C. S., Sali, A., . . . Heller, S. (2000). Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell*. 103(3), 525-35

Lin, G.L. & Hankenson, K.D. (2011). Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation
69. *J.Cell Biochem.*, 112(12), 3491-3501.

Lorenzo, I.M., Liedtke, W., Sanderson, M.J., & Valverde, M.A. (2008). TRPV4 channel participates in receptor-operated calcium entry and ciliary beat frequency regulation in mouse airway epithelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 105(34), 12611-12616.

Mahaut-Smith, M.P., Hussain, J.F., & Mason, M.J. (1999). Depolarization-evoked Ca^{2+} release in a non-excitable cell, the rat megakaryocyte. *J.Physiol*, 515 (Pt 2), 385-390.

Malaval, L., Liu, F., Roche, P., & Aubin, J.E. (1999). Kinetics of osteoprogenitor – proliferation and osteoblast differentiation in vitro. *J.Cell Biochem.*, 74(4), 616-627.

Manolagas, S.C. (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr.Rev.*, 21(2), 115-137.

Masuyama, R., Vriens, J., Voets, T., Karashima, Y., Owsianik, G., Vennekens, R., Lieben, L., Torrekens, S., Moermans, K., Vanden Bosch, A., Bouillon, R., Nilius, B., & Carmeliet, G. (2008). TRPV4-mediated calcium influx regulates terminal differentiation of osteoclasts. *Cell Metab*, 8(3), 257-265.

Matsuo, K. & Irie, N. (2008). Osteoclast-osteoblast communication
4. *Arch.Biochem.Biophys.*, 473(2), 201-209.

Minke,B. (2010). The history of the Drosophila TRP channel: the birth of a new channel superfamily. *J.Neurogenet.*, 24(4), 216-233.

Misiorowski,W. (2011). Parathyroid hormone and its analogues--molecular mechanisms of action and efficacy in osteoporosis therapy. *Endokrynol.Pol.*, 62(1), 73-78.

Mizoguchi,F., Mizuno,A., Hayata,T., Nakashima,K., Heller,S., Ushida,T., Sokabe,M., Miyasaka,N., Suzuki,M., Ezura,Y., & Noda,M. (2008). Transient receptor potential vanilloid 4 deficiency suppresses unloading-induced bone loss. *J.Cell Physiol*, 216(1), 47-53.

Mullins,L.P., McGarry,J.P., Bruzzi,M.S., & McHugh,P.E. (2007). Micromechanical modelling of cortical bone. *Comput.Methods Biomech.Biomed.Engin.*, 10(3), 159-169.

Muramatsu,S., Wakabayashi,M., Ohno,T., Amano,K., Ooishi,R., Sugahara,T., Shiojiri,S., Tashiro,K., Suzuki,Y., Nishimura,R., Kuhara,S., Sugano,S., Yoneda,T., & Matsuda,A. (2007). Functional gene screening system identified TRPV4 as a regulator of chondrogenic differentiation. *J.Biol.Chem.*, 282(44), 32158-32167.

Nakahama,K. (2010). Cellular communications in bone homeostasis and repair. *Cell Mol.Life Sci*, 67(23), 4001-4009.

Nilius,B. & Owsianik,G. (2011). The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol.*, 12(3), 218.

Nilius,B., Vriens,J., Prenen,J., Droogmans,G., & Voets,T. (2004). TRPV4 calcium entry channel: a paradigm for gating diversity. *Am.J.Physiol Cell Physiol*, 286(2), C195-C205.

Pan,Z., Yang,H., & Reinach,P.S. (2011). Transient receptor potential (TRP) gene superfamily encoding cation channels. *Hum.Genomics*, 5(2), 108-116.

Pautke,C., Schieker,M., Tischer,T., Kolk,A., Neth,P., Mutschler,W., & Milz,S. (2004). Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. *Anticancer Res.*, 24(6), 3743-3748.

Pedersen,S.F., Owsianik,G., & Nilius,B. (2005). TRP channels: an overview. *Cell Calcium*, 38(3-4), 233-252.

Petersen,O.H., Michalak,M., & Verkhatsky,A. (2005b). Calcium signalling: past, present and future. *Cell Calcium*, 38(3-4), 161-169.

Phan,T.C., Xu,J., & Zheng,M.H. (2004). Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. *Histol.Histopathol.*, 19(4), 1325-1344.

Plant,T.D. & Strotmann,R. (2007). TRPV4: A Multifunctional Nonselective Cation Channel with Complex Regulation.

Raggatt,L.J. & Partridge,N.C. (2010). Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J.Biol.Chem.*, 285(33), 25103-25108.

Raisz,L.G. (1999). Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin.Chem.*, 45(8 Pt 2), 1353-1358.

Ramsey,I.S., Dellling,M., & Clapham,D.E. (2006). An introduction to TRP channels. *Annu.Rev.Physiol*, 68, 619-647.

Rho,J.Y., Kuhn-Spearing,L., & Zioupos,P. (1998). Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med.Eng Phys.*, 20(2), 92-102.

Ridley,A.J., Schwartz,M.A., Burridge,K., Firtel,R.A., Ginsberg,M.H., Borisy,G., Parsons,J.T., & Horwitz,A.R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, 302(5651), 1704-1709.

Sims,N.A. & Gooi,J.H. (2008). Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin.Cell Dev.Biol.*, 19(5), 444-451.

Song,M.Y. & Yuan,J.X. (2010). Introduction to TRP channels: structure, function, and regulation. *Adv.Exp.Med.Biol.*, 661, 99-108.

Srivastava,S., Toraldo,G., Weitzmann,M.N., Cenci,S., Ross,F.P., & Pacifici,R. (2001). Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)-induced JNK activation. *J.Biol.Chem.*, 276(12), 8836-8840.

Stark,Z. & Savarirayan,R. (2009). Osteopetrosis. *Orphanet.J.Rare.Dis.*, 4, 5.

Troadec, J.D., Thirion, S., Laugier, J.P., & Nicaise, G. (1998). Calcium-induced calcium increase in secretory vesicles of permeabilized rat neurohypophyseal nerve terminals. *Biol. Cell*, 90(4), 339-347.

Vaananen, H.K., Zhao, H., Mulari, M., & Halleen, J.M. (2000). The cell biology of osteoclast function. *J. Cell Sci*, 113 (Pt 3), 377-381.

Vennekens, R., Owsianik, G., & Nilius, B. (2008). Vanilloid transient receptor potential cation channels: an overview. *Curr. Pharm. Des.*, 14(1), 18-31.

Verma, P., Kumar, A., & Goswami, C. (2010). TRPV4-mediated channelopathies. *Channels (Austin.)*, 4(4), 319-328.

Vincent, F., Acevedo, A., Nguyen, M.T., Dourado, M., Defalco, J., Gustafson, A., Spiro, P., Emerling, D.E., Kelly, M.G., & Duncton, M.A. (2009). Identification and characterization of novel TRPV4 modulators. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 389(3), 490-494.

Vriens, J., Appendino, G., & Nilius, B. (2009). Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. *Mol. Pharmacol.*, 75(6), 1262-1279.

Wang, D., Christensen, K., Chawla, K., Xiao, G., Krebsbach, P.H., & Franceschi, R.T. (1999). Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential. *J. Bone Miner. Res.*, 14(6), 893-903.

Waning, J., Vriens, J., Owsianik, G., Stuwe, L., Mally, S., Fabian, A., Fripiat, C., Nilius, B., & Schwab, A. (2007). A novel function of capsaicin-sensitive TRPV1 channels: involvement in cell migration. *Cell Calcium*, 42(1), 17-25.

Wei, C., Wang, X., Zheng, M., & Cheng, H. (2012). Calcium gradients underlying cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 24(2), 254-261.

Willette, R.N., Bao, W., Nerurkar, S., Yue, T.L., Doe, C.P., Stankus, G., Turner, G.H., Ju, H., Thomas, H., Fishman, C.E., Sulpizio, A., Behm, D.J., Hoffman, S., Lin, Z., Lozinskaya, I., Casillas, L.N., Lin, M., Trout, R.E., Votta, B.J., Thormeloe, K., Lashinger, E.S., Figueroa, D.J., Marquis, R., & Xu, X. (2008). Systemic activation of the transient receptor potential vanilloid subtype 4 channel causes endothelial failure and circulatory collapse: Part 2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 326(2), 443-452.

Yamaguchi,A., Komori,T., & Suda,T. (2000). Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr.Rev.*, 21(4), 393-411.

Yamaguchi,T., Chattopadhyay,N., Kifor,O., Butters,R.R., Jr., Sugimoto,T., & Brown,E.M. (1998). Mouse osteoblastic cell line (MC3T3-E1) expresses extracellular calcium (Ca^{2+})-sensing receptor and its agonists stimulate chemotaxis and proliferation of MC3T3-E1 cells. *J.Bone Miner.Res.*, 13(10), 1530-1538.

Zaninetti,R., Fornarelli,A., Ciarletta,M., Lim,D., Caldarelli,A., Pirali,T., Cariboni,A., Owsianik,G., Nilius,B., Canonico,P.L., Distasi,C., & Genazzani,A.A. (2011). Activation of TRPV4 channels reduces migration of immortalized neuroendocrine cells. *J.Neurochem.*, 116(4), 606-615.

Zhou,F.W., Matta,S.G., & Zhou,F.M. (2008). Constitutively active TRPC3 channels regulate basal ganglia output neurons. *J.Neurosci.*, 28(2), 473-482.